

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA EPIDEMIOLOGÍA Y ALTERNATIVAS DE MANEJO  
AGROECOLÓGICO DEL OJO DE GALLO (*Mycena citricolor*) EN CAFETO BAJO  
SISTEMAS AGROFORESTALES EN  
COSTA RICA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en  
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado y título de Doctorado  
Académico en Sistemas de Producción Agrícola Tropical Sostenible

MARÍA DEL MILAGRO GRANADOS MONTERO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2015

## Dedicatoria

---

Todo este esfuerzo es para mi familia, Erick, Josué y Amanda.

Los amo.

## Agradecimientos

---

A Dios por darme las fuerzas para concluir esta meta, a mi familia por darme su amor, calidez y comprensión en momentos difíciles y a mis amigos por todo su apoyo.

A don Edgar Vargas (q.e.g.e.) por enseñarme el verdadero sentido de ser profesional.

Agradezco de todo corazón a Gustavo Arroyo Arias por su incondicional ayuda, por su voz de aliento y su valiosa amistad.

A mí Comité Asesor por su colaboración durante todo el proceso, por todos los consejos y apoyo para lograr la conclusión del programa. Además, a Juan Ramón Navarro Flores por su gran ayuda en el análisis de los datos.

Agradezco a todas las personas del Instituto Earthwatch, de CoopeDota R.L, del Centro Agrícola Cantonal de Tarrazú, a todos los caficultores y personas relacionadas con la actividad que permitieron que se realizara esta investigación.

Finalmente, al programa de becas SEP-CONARE, a doña Rita Vargas de la Vicerrectoría de Docencia y doña Rita Vázquez del Sistema de Estudios de Posgrado, así como a los miembros de la Escuela de Agronomía que permitieron que culminara mis estudios de doctorado.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Doctorado Académico en Sistemas de Producción Agrícola Tropical Sostenible.”



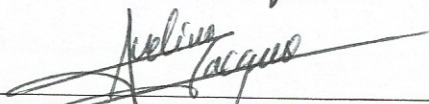
Dr. Paul Esker

**Representante Decana Sistema de Estudios de Posgrado**



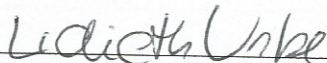
Dr. Felipe Aráuz Cavallini

**Director de Tesis**



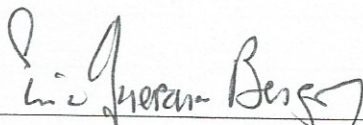
Dr. Jacques Avelino

**Asesor**



Dra. Lidieth Uribe Lorío

**Asesora**



Dr. Eric Guevara Berger

**Director Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales**



María del Milagro Granados Montero

**Candidata**



## Tabla de contenido

---

<b>Introducción general</b> .....	1
<b>Objetivo general y objetivos específicos</b> .....	4
Objetivo general .....	4
Objetivos específicos .....	4
<b>Capítulo 1. Revisión de literatura</b> .....	5
I. El cultivo y su socioagroecosistema .....	5
I.1. Origen y distribución .....	5
I.2 Importancia socioeconómica .....	5
I.3 Taxonomía y botánica .....	6
I.4 Características generales .....	7
I.5 Variedades .....	9
I.6 Requerimientos agroecológicos .....	12
I.7 Cultivo .....	12
I.8 Agroecosistema .....	14
II. El patógeno y su ciclo .....	17
II.1 Taxonomía .....	18
II.2 Morfología .....	19
II.3 Ciclo de vida .....	25
II.4 Distribución geográfica .....	28
II.5 Biología .....	30
II.6 Hospederos .....	31
III. El patosistema .....	36
IV. La enfermedad y su epidemiología .....	37
V. El manejo de la enfermedad .....	40
VI. Literatura citada .....	45
Ubicación y descripción general de las áreas de estudio .....	56

<b>Capítulo 2. Identificación de fuentes de inóculo primario y determinación de la patogenicidad del inóculo.....</b>	<b>59</b>
Resumen.....	59
Introducción .....	60
Materiales y Métodos.....	62
1. Cuantificación de la intensidad de la enfermedad y del nivel de inóculo inicial en caféto .....	62
a. Selección de parcelas para muestreo .....	62
b. Cuantificación de la incidencia de la enfermedad y del nivel de inóculo .....	62
2. Identificación de fuentes de inóculo diferentes al cultivo .....	63
a. Suelo y hojarasca.....	63
b. Vegetación acompañante .....	67
3. Determinación de la patogenicidad del inóculo.....	69
Resultados .....	72
1. Cuantificación de la incidencia de la enfermedad y del nivel de inóculo residual en caféto .....	72
1. Identificación de fuentes de inóculo .....	75
a) Suelo y hojarasca.....	75
b) Vegetación acompañante: árboles y arvenses .....	77
2. Determinación de la patogenicidad del inóculo.....	94
Discusión .....	102
Conclusiones .....	111
Recomendaciones .....	112
Literatura citada .....	113
<b>Capítulo 3. Impacto de la hojarasca y del inóculo primario sobre la epidemia. ...</b>	<b>116</b>
Resumen.....	116
Introducción .....	117
Materiales y Métodos.....	119
1. Caracterización de las áreas de estudio.....	119
2. Establecimiento de los ensayos.....	120

3. Manejo y análisis de los datos .....	123
Resultados .....	131
1. Año epidemiológico 2013.....	131
2. Año epidemiológico 2014.....	142
Discusión .....	152
Conclusiones .....	162
Recomendaciones .....	162
Literatura citada .....	163
<b>Capítulo 4. Efecto de la aplicación de metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> sobre la epidemia.</b> .....	167
Resumen.....	167
Introducción .....	168
Materiales y Métodos.....	170
1. Caracterización de las áreas de estudio.....	170
2. Establecimiento de los ensayos.....	171
3. Manejo y análisis de los datos .....	172
Resultados .....	173
Discusión .....	177
Sugerencias .....	181
Literatura citada .....	182
<b>Discusión general</b> .....	184
Literatura citada .....	199
<b>Conclusiones generales</b> .....	203
<b>Recomendaciones generales</b> .....	204

## Resumen

---

La investigación se llevó a cabo luego de la última epidemia fuerte de ojo de gallo en el 2010, cuando se contabilizó \$60 millones USD de pérdidas concentradas en las zonas del Valle Central y de Los Santos. En Costa Rica se presentan ataques cíclicos relacionados con el aumento de las precipitaciones y del inóculo y se prevé que pueda volver a presentarse una epidemia fuerte en 2016-2017 debido a la posible afectación de un evento de La Niña. Por lo que se realizó esta investigación para evaluar el impacto relativo del inóculo primario según la fuente sobre la epidemiología del ojo de gallo y diseñar estrategias agroecológicas basadas en ese conocimiento, para tratar de implementar un adecuado manejo de la enfermedad. Se realizó entre 2011 y 2014 en la zona de Los Santos, Costa Rica. Se visitaron 27 fincas tanto de productores independientes como de asociados a las cooperativas de Tarrazú y Dota, así como la finca experimental del Centro Agrícola Cantonal de Tarrazú. El trabajo se compuso de pruebas de laboratorio, invernadero y campo. Se reportaron 13 nuevos géneros de plantas hospedantes, no fue posible recuperar *Mycena citricolor* a partir de suelo ni hojarasca y se documentó que el hongo está presente fuera del continente americano. Se determinó el índice de patogenicidad (IP) de 17 cepas del hongo, 15 provenientes de vegetación acompañante, una recuperada de café CR95 (McK) y una de Caturra (McCa), usada como patrón de comparación. Once de las cepas fueron mantenidas *in vitro* previo a la prueba, los valores estuvieron entre 0,00 para la cepa proveniente de *Erythrina poeppigiana* (producida *in vitro*) y 18,87 para *Bryophyllum calycinum* (recuperada directamente de campo), la cepa McK presentó un IP de 9,94 y la cepa McCa de 3,67, ambas procedentes de campo. Todas las cepas *in vitro* tuvieron IP menor a las cepas de campo. Por otro lado, la eliminación del inóculo primario presente en la planta de café, a inicios de la época lluviosa, bajo las condiciones de esta investigación, redujo alrededor del 10% el porcentaje acumulado de enfermedad al final de la estación; mientras que no se halló efecto de la presencia o ausencia de hojarasca sobre la epidemia. Se determinó que el modelo logístico de desarrollo fue el que mejor describió la epidemia y se encontraron valores de velocidad de desarrollo ( $r$ ) entre 0,03 y 0,05 unidades por día. No se halló diferencia significativa entre el ABCDE, tanto para promedio de lesiones como de geminíferos activos, para aplicaciones de fungicida (642,78) y metabolitos secundarios de *Trichoderma* ya fuera al follaje (2472,72) o al suelo y hojarasca (1695,41), probablemente debido a la alta variabilidad del sistema. Se concluye que parte de la vegetación actúa como fuente de inóculo para el ojo de gallo, que el mantenimiento *in vitro* del hongo disminuye su patogenicidad y que no hay interacción entre el inóculo primario y la presencia de hojarasca sobre el desarrollo de la enfermedad en años con baja precipitación. Por último, no fue posible determinar con claridad el efecto de las aplicaciones de metabolitos secundarios de *Trichoderma* sobre la epidemia.

## Lista de cuadros

---

<b>Cuadro 1.</b> Listado de las especies de plantas reportadas como hospederas de <i>M.citricolor</i> .....	31
<b>Cuadro 2.</b> Identificador, ubicación y actividades realizadas en las fincas donde se realizaron los estudios. Zona de Los Santos, Costa Rica, 2011-2014.....	57
<b>Cuadro 3.</b> Código de la actividad, descriptor y objetivo relacionado a las actividades realizadas en campo. Zona de Los Santos, Costa Rica, 2011-2014.....	58
<b>Cuadro 2.1.</b> Código, fuente de inóculo y procedencia de las cepas de <i>M. citricolor</i> presentes en cultivo, árboles de sombra y arvenses utilizadas en el Bioensayo 1. San José, Costa Rica, 2014.....	69
<b>Cuadro 2.2.</b> Incidencia promedio (%), lesiones por hoja promedio y geminíferos/lesión promedio en las plantas muestreadas en las parcelas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, nov 2011 y oct 2012.....	73
<b>Cuadro 2.3.</b> Altura promedio (cm) y número de tallos en producción promedio de las 5 plantas muestreadas en cada parcela de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, nov 2011 y oct 2012.....	74
<b>Cuadro 2.4.</b> Lesiones totales, porcentaje de lesiones viejas y nuevas, porcentaje de lesiones viejas con geminíferos y lesiones nuevas con geminíferos, promedio de geminíferos por lesión vieja y promedio de geminíferos por lesión nueva en 150 hojas de cafeto muestreadas en tres fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, Julio 2013.....	75
<b>Cuadro 2.5.</b> Especies de árboles registradas en 27 fincas con historial de ojo de gallo, porcentaje de uso como sombra y presencia de síntomas y signos de <i>Mycena citricolor</i> , Zona de Los Santos, Costa Rica, 2011-2014.....	80
<b>Cuadro 2.6.</b> Especie, nombre común y familia de arvenses con síntomas y signos de <i>Mycena citricolor</i> halladas en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2012-2014.....	82
<b>Cuadro 2.7.</b> Código, fuente de inóculo y procedencia de las cepas de <i>M. citricolor</i> recuperadas de cultivo, árboles de sombra y arvenses presentes en las fincas de estudio, en la Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....	87
<b>Cuadro 2.8.</b> Densidad (píxeles) y descripción del micelio de 10 cepas de <i>M. citricolor</i> con 30 días de exposición a la luz, colectadas a partir de arvenses y árboles de sombra en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....	90
<b>Cuadro 2.9.</b> Presencia, cantidad y % de área con geminíferos desarrollados sobre discos de follaje de café o micelio, luego de 8 días de colocación de los discos de follaje, de 12 cepas de <i>M. citricolor</i> colectadas a partir de cafeto en producción, arvenses y árboles de sombra, en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....	93
<b>Cuadro 2.10.</b> Porcentaje de éxito de infección de 7 cepas de <i>M. citricolor</i> provenientes de campo, colectado en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....	94
<b>Cuadro 2.11.</b> Diámetro y tiempo de aparición de lesiones desarrolladas en follaje de cafeto var. Caturra inoculado con gemas de campo provenientes de 7 cepas de <i>M. citricolor</i> , colectadas en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....	95

<b>Cuadro 2.12.</b> Cantidad máxima de geminíferos desarrollados, tiempo de aparición de los primordios y tiempo a máxima cantidad de geminíferos originados por las lesiones producidas en follaje de cafeto var. Caturra inoculado con gemas de campo provenientes de 7 cepas de <i>M. citricolor</i> , procedentes de las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....	97
<b>Cuadro 2.13.</b> Porcentaje de éxito de infección del inóculo tomado de 13 fuentes de inóculo de <i>M. citricolor</i> provenientes de cultivo <i>in vitro</i> , colectado en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....	98
<b>Cuadro 2.14.</b> Diámetro y tiempo de aparición de lesiones desarrolladas en follaje de cafeto var. Caturra inoculado con gemas de 13 cepas de <i>M. citricolor</i> , provenientes de las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....	100
<b>Cuadro 2.15.</b> Cantidad máxima de geminíferos desarrollados, tiempo de aparición de los primordios y tiempo a máxima cantidad de geminíferos originados por las lesiones producidas en follaje de cafeto var. Caturra inoculado con gemas producidas en laboratorio, de 13 fuentes de <i>M. citricolor</i> , provenientes de las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....	101
<b>Cuadro 2.16.</b> Índice y nivel de patogenicidad para las 17 cepas de <i>M. citricolor</i> estudiadas.....	101
<b>Cuadro 3.1.</b> Temperaturas (°C) mínima y máxima y precipitación acumulada para los años de estudio. Zona de los Santos, 2013-2014.....	130
<b>Cuadro 3.2.</b> Altura (cm) de plantas, número de tallos por planta y altura (cm), diámetro (cm) del tronco principal y género de los árboles presentes en las áreas de estudio donde se ubicó cada tratamiento del ensayo remoción de hojarasca y remoción de inóculo inicial. Zona de Los Santos, 2013.....	132
<b>Cuadro 3.3.</b> Contenido nutricional del suelo en las áreas de estudio donde se ubicó cada tratamiento del ensayo de remoción de hojarasca e inóculo primario. Zona de Los Santos, 2013.....	132
<b>Cuadro 3.4.</b> Contenido nutricional del follaje de las plantas ubicadas en cada tratamiento del ensayo de remoción de hojarasca e inóculo primario. Zona de Los Santos, 2013.....	132
<b>Cuadro 3.5.</b> Hojas enfermas, lesiones y geminíferos activos totales, promedio de lesiones por hoja y porcentaje promedio de lesiones con geminíferos para todo el período de evaluación de los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.....	135
<b>Cuadro 3.6.</b> Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad de acuerdo al % acumulado final de hojas enfermas (HED3), % acumulado final de lesiones (LD3) y % acumulado final de geminíferos activos (GD3), para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.....	136
<b>Cuadro 3.7.</b> Resumen de los estadísticos del análisis de regresión lineal simple usados en la evaluación de la conveniencia de los modelos monomolecular, logístico y Gompertz para describir el progreso del ojo de gallo en cada tratamiento de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.....	137
<b>Cuadro 3.8.</b> Área bajo la curva de desarrollo del crecimiento del hospedero (Crec), la defoliación total del hospedero (Def) y defoliación de hojas enfermas (DefHE), para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.....	140

<b>Cuadro 3.9.</b> Coeficientes de correlación de Spearman para las variables evaluadas en el tratamiento ConH/ConIP (manejo tradicional) de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.....	141
<b>Cuadro 3.10.</b> Coeficientes de correlación de Spearman para las asociaciones de condiciones ambientales y total de geminíferos por tratamiento del experimento de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.....	142
<b>Cuadro 3.11.</b> Vegetación acompañante presente en las áreas de estudio donde se ubicó cada tratamiento del ensayo remoción de hojarasca y remoción de inóculo inicial. Zona de Los Santos, 2014.....	143
<b>Cuadro 3.12.</b> Hojas enfermas, lesiones, geminíferos activos totales, lesiones por hoja promedio y geminíferos por lesión promedio para todo el período de evaluación de los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.....	145
<b>Cuadro 3.13.</b> Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad de acuerdo al porcentaje acumulado final de hojas enfermas (HED3), porcentaje acumulado final de lesiones (LD3) y porcentaje acumulado final de geminíferos activos (GD3), para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014 .....	145
<b>Cuadro 3.14.</b> Resumen de los estadísticos del análisis de regresión lineal simple usados en la evaluación de la conveniencia de los modelo monomolecular, logístico y Gompertz para describir el progreso del ojo de gallo en cada tratamiento de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.....	148
<b>Cuadro 3.15.</b> Área bajo la curva de desarrollo del crecimiento del hospedero (Crec), la defoliación total del hospedero (Def) y la defoliación de hojas enfermas (DefHE), para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.....	150
<b>Cuadro 3.16.</b> Coeficientes de correlación de Spearman para las variables evaluadas en el tratamiento ConH/ConIP de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.....	151
<b>Cuadro 3.17.</b> Coeficientes de correlación de Spearman para las asociaciones de condiciones ambientales con total de geminíferos y geminíferos por lesión por tratamiento del experimento de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.....	152
<b>Cuadro 4.1.</b> Topografía, altura de plantas (cm), número de tallos por planta y altura (cm), diámetro (cm) del tronco principal y género de los árboles presentes en las áreas de estudio donde se ubicó cada tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> . Zona de Los Santos, 2013 .....	173
<b>Cuadro 4.2.</b> Contenido nutricional del suelo en las áreas de estudio donde se ubicó cada tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> . Zona de Los Santos, 2013.....	174
<b>Cuadro 4.3.</b> Contenido nutricional del follaje de las plantas ubicadas en cada tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> . Zona de Los Santos, 2013. ....	174
<b>Cuadro 4.4.</b> Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDL) por tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> . Zona de Los Santos, 2013.....	174

<b>Cuadro 4.5.</b> Cantidad total de lesiones de ojo de gallo durante todo el período de evaluación por tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> . Zona de Los Santos, 2013 .....	175
--	-----

<b>Cuadro 4.6.</b> Cantidad total de geminíferos activos de <i>Mycena citricolor</i> durante todo el período de evaluación por tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> . Zona de Los Santos, 2013.....	175
--	-----



## Lista de Figuras

---

<b>Figura 1.1.</b> Representación de los tipos de crecimiento de la planta de café. Tomado de Sotomayor (1993).....	7
<b>Figura 1.2.</b> Morfología y distribución de raíces de una planta de <i>C. arabica</i> . Tomado de Arcila-Pulgarin (2007).....	8
<b>Figura 1.3.</b> Etapas fenológicas de la planta de cafeto según Morais <i>et al.</i> (2005).....	9
<b>Figura 1.4.</b> Representación gráfica de los diferentes portes en las variedades comerciales tradicionales. Tomado de García (2015).....	11
<b>Figura 1.5.</b> Diagrama de diferentes sistemas de arborización de cafetales. A) Rústico, B) Policultivo tradicional, C) Policultivo comercial, D) Monocultivo con sombra y E) Monocultivo al sol. Modificado de Perfecto <i>et al.</i> (2007).....	14
<b>Figura 1.6.</b> Esquema de un agrosistema cafetalero. Tomado de Fournier (1988).....	16
<b>Figura 1.7.</b> A) Ilustración de las dimensiones del basidiocarpo de <i>Mycena citricolor</i> . B) Vista de la parte inferior de un píleo extendido de <i>Mycena citricolor</i> , para mostrar disposición de las laminillas. A. Modificada de Mounblac y Rangel (1914). B. Tomada de Buller (1958).....	19
<b>Figura 1.8.</b> A) Cheilocistidios y B) Basidiosporas de <i>Mycena citricolor</i> . Tomado de Pegler (1987).	20
<b>Figura 1.9.</b> Vista longitudinal de una laminilla de <i>Mycena citricolor</i> . Tomado de Buller (1958)...	20
<b>Figura 1.10.</b> Basidios. A) y B) Basidiocarpos desarrollados de material de campo. C) y D) Basidiocarpos producidos en laboratorio, C: a partir de lesión joven colectada en la época seca, D: producidos <i>in vitro</i> .....	21
<b>Figura 1.11.</b> Geminíferos de <i>Mycena citricolor</i> .....	22
<b>Figura 1.12.</b> Ilustración del geminífero de <i>Mycena citricolor</i> mostrando todas sus partes. Modificado de Buller (1958).....	22
<b>Figura 1.13.</b> Sinemas de <i>Tretopileus sphaerophorus</i> . A) Sinemas maduros produciendo bulbillos, B) Mucus entre estípites y bulbo, C) y D) Bulbillos. Escala A, C y D: 50 µm, B: 100 µm. Modificado de Okada <i>et al.</i> (1998).....	23
<b>Figura 1.14.</b> Ilustración de las fases de desarrollo del geminífero de <i>Mycena citricolor</i> . Tomado de Buller (1958).....	24
<b>Figura 1.15.</b> Micrografía electrónica de barrido de los geminíferos de <i>Mycena citricolor</i> . Escala: 13 y 16: 100µm, 14 y 15: 50 µm. Tomado de Cole (1987).....	24

<b>Figura 1.16.</b> Comparación de los ciclos de vida de un hongo basidiomicete (A) y uno ascomicete (B). Tomado de <a href="http://science.kennesaw.edu/~jdirnber/Bio2108/Lecture/LecBiodiversity/31_Labeled_Images/">http://science.kennesaw.edu/~jdirnber/Bio2108/Lecture/LecBiodiversity/31_Labeled_Images/</a> .....	25
<b>Figura 1.17.</b> Mapa de distribución mundial del hongo <i>Mycena citricolor</i> al año 1996. Tomado de CAB International (1996).....	29
<b>Figura 1.18.</b> Mapa de distribución mundial del hongo <i>Mycena citricolor</i> al año 2015. Tomado de Plantwise Knowledge Bank (2015).....	30
<b>Figura 1.19.</b> Sintomatología del ojo de gallo. A) Defoliación, B) Lesiones, C) Estructuras pequeños (geminíferos) y estructura grande (basidiocarpio), D) Síntomas y signos en fruto.....	38
<b>Figura 1.20.</b> Ubicación de la zona de estudio.....	56
<b>Figura 2.1.</b> Mantenimiento de muestras. A) Cámaras húmedas, B) Hojarasca mantenida en invernadero, C) Mantenimiento de plantas en invernadero y D) Mantenimiento de plantas en casa de sarán.....	65
<b>Figura 2.2.</b> Técnicas de aislamiento del patógeno. A) y B) Por medio de centrifugación, A) Colocación de puntos de sedimento en medio de cultivo, B) Colocación de sedimento y discos de follaje de café en medio de cultivo. C) y D) Por medio de licuado, C) Dispersión de la suspensión en medio de cultivo, D) Dispersión de la suspensión en medio de cultivo y colocación de discos de follaje de café. ....	66
<b>Figura 2.3.</b> Composición del piso del cafetal expresada como porcentaje promedio de hojarasca (H), suelo desnudo (S) y vegetación (V), en 1m <sup>2</sup> en las áreas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, nov. 2011.....	75
<b>Figura 2.4.</b> Composición del piso del cafetal expresada como porcentaje promedio de hojarasca (H), suelo desnudo (S) y vegetación (V), en 1m <sup>2</sup> en las áreas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, oct. 2012.....	76
<b>Figura 2.5.</b> Estado de las plantas luego de permanecer un año en casa de sarán en la finca CAT. A) Apariencia general de las plantas. B) Lesiones presentes: flecha blanca <i>Cercospora coffeicola</i> , flecha negra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	76
<b>Figura 2.6.</b> Hongos desarrollados en cajas con hojarasca mantenidas en el invernadero. A) y B) Agaricales. C) Rizomorfos de basidiomicete. D) Xylarial.....	77
<b>Figura 2.7.</b> Árboles de sombra con síntomas de ojo de gallo. A) y B) <i>Erythrina</i> spp., C) <i>Eriobotrya japonica</i> , D) <i>Psidium guajava</i> y E) <i>Persea americana</i> .....	78
<b>Figura 2.8.</b> Síntomas y signos de <i>Mycena citricolor</i> en <i>Erythrina poeppigiana</i> A) Lesiones. B) Geminíferos. C) Lesiones y caída de tejido muerto.....	79
<b>Figura 2.9.</b> Apariencia del área del cafetal con árboles de sombra de poró infectados con <i>Mycena citricolor</i> . A) Defoliación severa. B) Detalle de las lesiones en poró. C) Hojas de cafeto caídas por daño de ojo de gallo.....	79

**Figura 2.10.** Arvenses hospederas de *M. citricolor*. **A)** *Amaranthus* L., **B)** *A. cordifolia* (Ten.) Steenis, **C)** *Begonia* L., **D)** *B. calycinum* Salisb., **E)** *C. verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis, **F)** *C. donnell-smithii* Greenm., **G)** *Commelina* L., **H)** *D. deremensis* Engl., **I)** *I. nil* Roth, **J)** *S. assurgens* Ruiz & Pav., **K)** *P. candidum* Kunth, **L)** *P. dumosus* Macfad., **M)** y **N)** *Polypodium* L., **Ñ)** *P. caudatum* Maxon, **O)** *M. subsessilis* F. Muell.....83

**Figura 2.11.** Diámetro total (cm) de 250 lesiones presentes en 5 hospederos de *M. citricolor*, colectadas en las fincas CAT y CO, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....84

**Figura 2.12.** Promedios (cm) del diámetro total y del centro y ancho del anillo de 250 lesiones presentes en 5 hospederos de *M. citricolor*, colectadas en las fincas CAT y CO, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....85

**Figura 2.13.** Cantidad de geminíferos registrados en 250 lesiones presentes en 5 hospederos de *M. citricolor*, colectadas en las fincas CAT y CO, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....86

**Figura 2.14.** Lesiones producidas por *M. citricolor*. **A)** De izquierda a derecha *C. verticillata* (Cv), *A. cordifolia* (Ac), *B. calycinum* (Bc), café variedad Caturra (Ca) y café variedad CR95 (Catimor) (K). **B)** Detalle de lesión y geminífero en *A. cordifolia*. **C)** y **D)** Detalle de lesión presente en *B. calycinum*, **C)** Geminíferos y **D)** Zonación. **E)** Detalle de lesión y geminíferos en *C. verticillata*...86

**Figura 2.15.** Velocidad de crecimiento (cm/día) en medio de cultivo (PDA+Lev) de 13 cepas de *M. citricolor* recuperadas de cultivo, árboles de sombra y arvenses presentes en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....88

**Figura 2.16.** Micelio, geminíferos y basidiocarpos producidos por 3 cepas de *M. citricolor* con 15 días de exposición a la luz. **A)** McCv sin estructuras, **B)** McCd con presencia de geminíferos, **C)** McPa con presencia de basidiocarpos, **D)** Detalle de área con geminíferos, **E)** Detalle de área con basidiocarpos.....89

**Figura 2.17.** Densidad de micelio de 8 cepas de *M. citricolor* con 30 días de exposición a la luz. **A)** McSp **B)** McIn **C)** McCc **D)** McCo **E)** McPo **F)** McCv **G)** McIr **H)** McPa. Ordenados ascendentemente de acuerdo al valor de densidad en píxeles.....91

**Figura 2.18.** Micelio de 12 cepas de *M. citricolor* con 8 días de crecimiento a la oscuridad en medio de cultivo (PDA+Lev), recuperado de: **A)** y **B)** McAc **C)** y **D)** McBc, **E)** y **F)** McCa **G)** y **H)** McCc, **I)** y **J)** McCd **K)** y **L)** McCv, **M)** y **N)** McCo, **Ñ)** y **O)** McEp, **P)** y **Q)** McIr, **R)** y **S)** McIn, **T)** y **U)** McPa, **V)** y **W)** McPo .....92

**Figura 2.19.** Geminíferos y basidiocarpos producidos por 3 cepas de *M. citricolor* luego de 8 días de colocación de los discos de follaje. **A)** McCv **B)** y **C)** Detalle de estructuras producidas sobre discos y micelio de McCa **D)** Detalle de basidiocarpos producidos por McCc.....93

**Figura 2.20.** Velocidad de crecimiento (cm/día) de las lesiones desarrolladas en follaje de café var. Caturra inoculado con gemas de 7 cepas de *M. citricolor* provenientes de campo, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....96

**Figura 2.21.** Velocidad de crecimiento (cm/día) de las lesiones desarrolladas en follaje de cafeto var. Caturra, inoculado con gemas producidas en laboratorio, de 13 cepas de *M. citricolor*, provenientes de las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.....99

**Figura 3.1.** Diagrama del arreglo de tratamientos por bloque para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013 y 2014.....121

**Figura 3.2.** Comparación de tratamientos con remoción (A) y sin remoción (B) de hojarasca para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013 y 2014.....121

**Figura 3.3.** Marcaje de bandolas en plantas evaluadas para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013 y 2014.....122

**Figura 3.4.** Aplicación de cal en parcelas experimentales de los tratamientos con remoción (A) y sin remoción (B) de hojarasca, Zona de Los Santos, 2013 y 2014.....123

**Figura 3.5.** Aparatos meteorológicos ubicados en parcelas experimentales de los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013 y 2014. A. Sensor de mojadura foliar, B. Colector de datos meteorológicos WatchDog 1000 series con sensores internos de temperatura del aire y humedad relativa, C. Sensor de lluvia y cobertor meteorológico.....123

**Figura 3.6.** Condiciones de temperatura (°C) y humedad relativa (%) de la zona de estudio. Zona de Los Santos, 2013 -2014.....130

**Figura 3.7.** Condiciones de precipitación (mm) y mojadura foliar (horas) de la zona de estudio. Zona de Los Santos, 2013-2014.....131

**Figura 3.8.** Curva de desarrollo de la enfermedad expresada como incidencia acumulada (%) de hojas con lesiones de ojo de gallo. Zona de Los Santos, 2013.....133

**Figura 3.9.** Curva de desarrollo de la enfermedad expresada como lesiones acumuladas (%) de ojo de gallo. Zona de Los Santos, 2013.....134

**Figura 3.10.** Curva de desarrollo de geminíferos activos de *Mycena citricolor* en los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario. Zona de Los Santos, 2013.....135

**Figura 3.11.** Progreso del crecimiento del hospedero para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.....138

**Figura 3.12.** Progreso de la defoliación total para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.....139

<b>Figura 3.13.</b> Progreso de la defoliación de hojas enfermas en los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.....	139
<b>Figura 3.14.</b> Desarrollo de la enfermedad expresada como incidencia acumulada (%) de ojo de gallo. Zona de Los Santos, 2014.....	144
<b>Figura 3.15.</b> Desarrollo de la enfermedad expresada como lesiones acumuladas (%) de ojo de gallo. Zona de Los Santos, 2014.....	144
<b>Figura 3.16.</b> Curva de desarrollo de geminíferos activos de <i>Mycena citricolor</i> en los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario. Zona de Los Santos, 2014.....	146
<b>Figura 3.17.</b> Progreso del crecimiento del hospedero para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.....	147
<b>Figura 3.18.</b> Progreso de la defoliación total para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.....	149
<b>Figura 3.19.</b> Progreso de la defoliación de hojas enfermas en los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.....	149
<b>Figura 4.1.</b> Condiciones climáticas registradas en la zona de estudio. <b>A)</b> Temperatura (°C) y humedad relativa (%), <b>B)</b> Precipitación (mm) y mojadura foliar. Zona de Los Santos, 2013.....	172
<b>Figura 4.2.</b> Curva de progreso del ojo de gallo (cantidad presente de lesiones) por tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> . Zona de Los Santos, 2013.....	176
<b>Figura 4.3.</b> Cantidad presente de geminíferos activos por tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> . Zona de Los Santos, 2013.....	176
<b>Figura 5.1.</b> Diagrama del ciclo epidemiológico y el manejo convencional del ojo de gallo en caféto.....	195
<b>Figura 5.2.</b> Diagrama del ciclo epidemiológico y el manejo propuestos para ojo de gallo en caféto de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación.....	198

## Introducción general

---

El ojo de gallo, enfermedad causada por el hongo basidiomicete *Mycena citricolor* y también conocida como mancha americana de la hoja, gotera o candelilla, puede provocar severa defoliación y caída de frutos, por ende, elevadas pérdidas de cosecha en plantaciones de café.

En años con elevadas precipitaciones, como lo fue el 2010 (año Niña), se presentan problemas serios. De acuerdo a Barquero (2010 a y b) para octubre de ese año ya se habían perdido 75,622 fanegas de grano, lo que equivale a casi 20 000 toneladas de cerezas frescas, a consecuencia del ataque de ojo de gallo, sobretodo en el Valle Central y la Zona de Los Santos. Para diciembre, se contabilizó una pérdida del 12% (276,577 fanegas) de la cosecha estimada para el año productivo 2010-2011, lo que equivale aproximadamente a unos \$60 millones USD de pérdida. Avelino *et al.* (2007) consideran que el ojo de gallo es una enfermedad particularmente seria en Costa Rica, debido a que el sistema de cultivo utilizado es de los más intensivos a nivel mundial, especialmente en cuanto a distancias de siembra.

Usualmente, se considera que la enfermedad es importante en plantaciones viejas, mal manejadas y con exceso de sombrío; pero, en realidad se puede presentar en cafetales de cualquier edad con siembras densas o en dirección contraria al viento, malezas altas y plantas con exceso de ejes verticales; aún sin sombrío, pero con pocas horas de sol; ya que esas características benefician el crecimiento del hongo al propiciar alta humedad relativa y luz difusa. El desarrollo de este patógeno es favorecido en regiones entre 1,100 y 1,550 msnm; mismas altitudes óptimas para el desarrollo de un grano de alta calidad de exportación (CENICAFE s.f., Monterroso 1998, Vargas 2004, Avelino *et al.* 2007).

Desde hace casi seis décadas se han venido realizando esfuerzos por implementar estrategias de combate del ojo de gallo en Costa Rica, la mayoría químicas y algunas biológicas; y aunque algunos autores hablan de la importancia del manejo integrado tomando en cuenta, densidad de siembra, deshija, poda y manejo de malezas, no se ha logrado un adecuado combate, sobretodo en años con efecto Niña.

La escasez de estudios epidemiológicos básicos probablemente es la mayor limitante para desarrollar una estrategia de manejo apropiada, ya que no se cuenta con información clara

referente al ciclo de la enfermedad. Se reportan solamente tres estudios a nivel mundial de importancia en el tema, todos realizados en Costa Rica.

Wellman (1950) realizó un estudio pionero sobre aspectos de dispersión, pasaron más de 50 años hasta que Vargas (2004), estudiara la epidemiología del hongo, enfocado esta vez en el desarrollo de un sistema de pronóstico y finalmente, Avelino *et al.* (2007) publica acerca de las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, enfocado en las prácticas de cultivo y la topografía. Sin embargo, todos los estudios son mayormente descriptivos.

Debido a que esta enfermedad, aunque policíclica, es de desarrollo relativamente lento (tasa de infección aparente baja 0.02 - 0.015 unidades por día), el nivel de inóculo inicial toma importancia en la epidemia (Arauz 1998 y Wang y Arauz 1999).

Siendo así, esta enfermedad es más dependiente de la cantidad de inóculo primario que de la tasa de infección, lo que supone que la implementación de estrategias de manejo que consigan reducir el nivel de inóculo inicial lograrían retrasar considerablemente el desarrollo de la epidemia y por ende disminuir las pérdidas productivas y económicas.

Para reducir el inóculo primario es de suma importancia conocer donde está ubicado, según Avelino *et al.* (1999), en el ojo de gallo, al igual que para la roya anaranjada, la mayor fuente de inóculo inicial es el inóculo presente en las lesiones producidas el año anterior, denominado inóculo residual (IR). En el caso del ojo de gallo, según Ramírez (1994) el IR se mantiene en estado latente en lesiones viejas durante la época seca y activa su crecimiento cuando entran las primeras lluvias.

Sin embargo, se conoce que *Mycena citricolor* puede atacar al menos a 219 hospederos en 80 familias de plantas y que es uno de los géneros predominantes dentro de las comunidades de agaricales saprófitos presentes en la hojarasca fresca y madera de los pisos de bosques húmedos tropicales (Sequeira 1958, Hernández 2009). Por lo que es posible especular que parte del inóculo que inicia una nueva epidemia esté localizado en otras fuentes diferentes al cultivo.

Por lo que es relevante determinar si se encuentra sobreviviendo como habitante en el suelo o la hojarasca, si se mantiene en plantas de café (en cultivo o voluntarias) y si permanece en lesiones de hospederos alternos como árboles o arvenses. Se debe estudiar cuál es el impacto de cada fuente de inóculo, para luego trabajar en estrategias que logren reducir al máximo la más importante.



## **Objetivo general y objetivos específicos**

---

### **Objetivo general**

Evaluar el impacto relativo del inóculo primario según la fuente sobre la epidemiología del ojo de gallo y diseñar estrategias de manejo agroecológico basadas en ese conocimiento, para tratar de implementar un adecuado manejo de la enfermedad.

### **Objetivos específicos**

- I.** Identificar y cuantificar las fuentes de inóculo inicial, su viabilidad y eficacia infecciosa.
- II.** Determinar el impacto de la hojarasca y el inóculo primario en hojas de café sobre el desarrollo de la epidemia y la tasa de infección.
- III.** Correlacionar la temperatura, humedad relativa, precipitación y período de mojadura foliar sobre el desarrollo de la epidemia con y sin inóculo primario.
- IV.** Diseñar opciones de manejo agroecológico que incluyan las alternativas biológica y cultural en diferentes momentos de la epidemia, para tratar de disminuir la enfermedad.

## Capítulo 1. Revisión de literatura

---

### I. El cultivo y su socioagroecosistema

El café se considera el principal producto agrícola de consumo en el mundo y se estima que el 8% de la población mundial está involucrada en el mercado del café, desde su siembra hasta su consumo final. La producción mundial para el año 2014 fue mayor a 8,5 millones de toneladas, de éstas alrededor de un millón fueron producidas en México y Centroamérica, siendo que Costa Rica aportó 90.480 toneladas (DaMatta y Rodríguez 2007, ICO 2015).

Las dos principales especies cultivadas para producción son *Coffea arabica*, conocida como Arábica o Arábica y *C. canephora* conocida como café Robusta. El café Arábica representa el 60% de la producción mundial de café, mientras que el 40% es para el café Robusta. El primero se cultiva en zonas altas, se caracteriza por su fino aroma y acidez agradable; entre los países productores más reconocidos están Brasil, Colombia, Etiopía, Centroamérica, México, India y África del Este. Los Robusta son cafés más fuertes y de poca acidez, cultivados principalmente en tierras bajas en Vietnam, Brasil e Indonesia (Santacreo 2001, Jiménez 2013, ICO 2015).

#### I.1. Origen y distribución

El cafeto es una especie leñosa del sub-bosque, originaria de tierras altas (1400 a 1800 msnm) del sur de Etiopía. A principios del siglo XIV se consumía en los países árabes, en 1658 los holandeses hicieron las primeras plantaciones extensivas en lo que hoy es Sri Lanka, para 1748 ya estaba en América, en 1779 fue introducido en Costa Rica y para 1808 inició su cultivo para exportación, la primera de ellas hacia Panamá en 1820 (DaMatta y Rodríguez 2007, Jiménez 2013).

#### I.2 Importancia socioeconómica

El cultivo de café en Costa Rica, desde sus inicios mejoró la condición socioeconómica y moldeó la nacionalidad del costarricense. Hizo que se pasara de la agricultura de subsistencia

a la de exportación (Jiménez 2013). Permitió el desarrollo integral de las comunidades por medio del valor de la solidaridad, intrínseco en el cooperativismo que aún se mantiene vigente.

El café continúa estando dentro de los principales cultivos de la economía costarricense, siendo el cultivo perenne con mayor área cultivada, 84 133 hectáreas distribuidas en 8 zonas cafetaleras, Valle Central, Tres Ríos, Turrialba, Brunca, Guanacaste, Tarrazú, Orosi y Valle Occidental. Con más de 50 000 familias dedicadas a esta actividad, de las cuales el 90% son pequeños y medianos productores. Gran parte de la mejor calidad de café se produce en Tarrazú (Zona de Los Santos), la cual se ubica mayormente en altitudes superiores a los 1 304 msnm y que al tener influencia Pacífica, la hace más vulnerable al cambio climático (Chaves *et al.* 2010, ICAFE 2011, Montenegro 2011, ICAFE 2012, INEC 2015).

Junto con el té y las especias ocupa el segundo puesto de importancia en las exportaciones del sector agrícola costarricense, generando 289 millones de dólares americanos, lo que representa el 11% del valor de estas exportaciones. De ese monto, 275,9 millones corresponden a la venta de 72 556 toneladas de café oro a Estados Unidos principalmente (54%) (PROCOMER 2015).

### **I.3 Taxonomía y botánica**

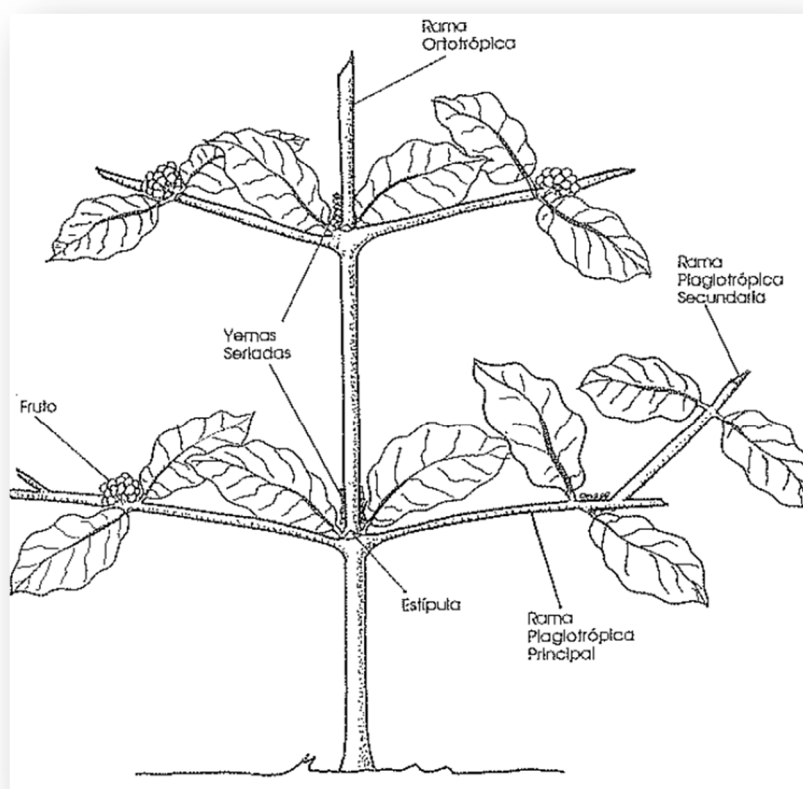
La planta de café que más se cultiva actualmente, del género *Coffea* y especie *arabica*, fue descrita por Carl Von Linneus en mayo de 1753. Pertenece a la familia Rubiaceae (Juss.), orden Gentianales (Juss. ex Bercht. & J. Presl), clase Equisetopsida (C. Agardh) (Tropicos 2015).

Son arbustos o arbolitos hasta 8 m de alto, glabrescentes. Hojas opuestas, elíptico-oblongas, de ápice acuminado, base aguda a acuminada, papiráceas, brillantes en el haz, con nervios secundarios, pecíolos y estípulas. Inflorescencias con bractéolas, flores subsésiles, limbo calicino, tubo corolino y lóbulos (Linneus 1753, Tropicos 2015).

## I.4 Características generales

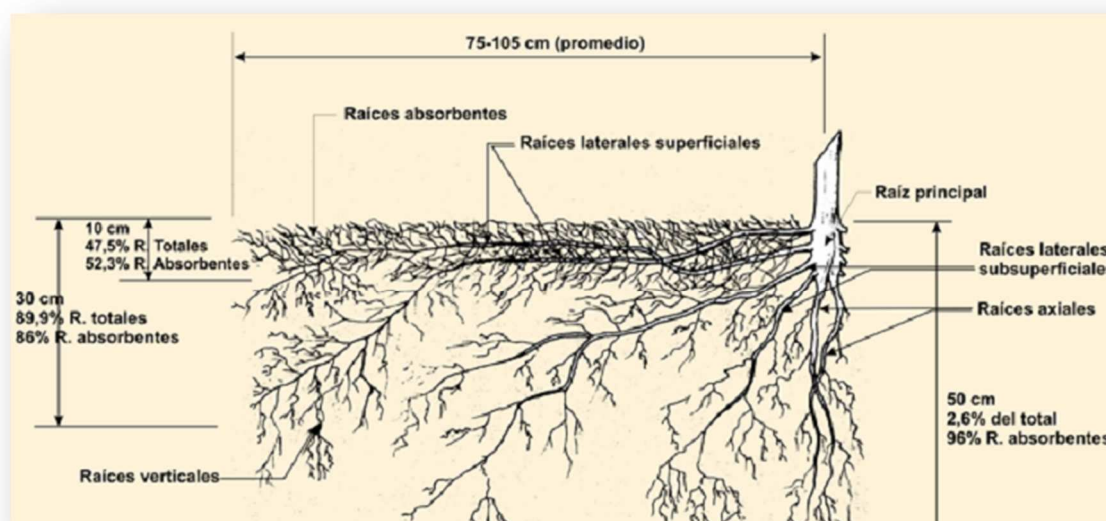
*C. arabica* es la única especie autógama, aunque se puede dar entre un 8 a 10% de polinización cruzada entre plantas diferentes. Es alotetraploide ( $2n=44$ ), autofértil y se propaga principalmente mediante semillas (Arcila-Pulgarín *et al.* 2001, Santacreo 2001).

En la planta de café se reconoce un eje central de crecimiento vertical (ortotrópico) que solo produce yemas, y un crecimiento de ramas laterales primarias o plagiotrópicas (bandolas) que se alargan en forma permanente, lo que le confiere su forma piramidal. Las bandolas dan origen a las ramas secundarias y estas a las terciarias, denominadas palmillas. Las bandolas se van estableciendo de forma progresiva en pares y en forma opuesta, de igual manera sus hojas se disponen en pares en lados opuestos al nudo (Sotomayor 1993).



**Figura 1.1.** Representación de los tipos de crecimiento de la planta de café. Tomado de Sotomayor (1993).

El cafeto posee un sistema radical constituido de raíz pivotante central (muy fuerte, profundiza hasta 45 cm), raíces axiales (de 4 a 8, penetran hasta 3 m), raíces laterales (superficiales, crecimiento horizontal hasta 1,5 m del tronco) y raíces absorbentes (crecen sobre las anteriores). La mayor cantidad de raíces activas se encuentra en los primeros 10 cm de profundidad, y se extiende entre 1,0 y 1,5 m desde el tronco. En los primeros 30 cm se encuentra el 86% de las raíces absorbentes y un 90% de las raíces totales del cafeto (Arcila-Pulgarín 2007).



**Figura 1.2.** Morfología y distribución de raíces de una planta de *C. arabica*. Tomado de Arcila-Pulgarín (2007).

Existen varias formas utilizadas en la caracterización del ciclo fenológico del cafeto, entre ellas la de Camargo y Camargo (2001) de 6 fases: 1) vegetativo y formación de yemas foliares, 2) inducción y maduración de yemas florales, 3) floración, 4) producción de frutos, 5) maduración de frutos y 6) reposo y senescencia de ramas. Por otro lado Pezzopane *et al.* (2003) describen el desarrollo fenológico en 11 etapas: 0) yema latente, 1) yema entumecida, 2) abotonado, 3) floración, 4) posfloración, 5) fruto tamaño de arveja, 6) expansión de frutos, 7) grano verde, 8) caña verde, 9) cereza, 10) pasa y 11) seco. Mientras que Morais *et al.* (2005) contemplan tres grandes fases, denominadas “G” para inducción de yema floral, “F”

para floración y “C” para fructificación, y luego lo detallan en 13 fases: de G1 a G6, F, y de C1 a C6 (Figura 3).

## I.5 Variedades

### i. Tradicionales

Las primeras variedades de cafeto fueron Typica y Bourbon, las únicas cultivadas en América hasta mediados del siglo pasado. Ambas conocidas como variedades criollas, son de porte alto (3m de altura) y baja productividad. La primera con entrenudos largos, sus bandolas forman ángulo de 60° con el eje principal y con brotes nuevos color bronce; la segunda con entrenudos más cortos, ángulo de 45° y brotes verde tierno (Jiménez 2013, García 2015).



**Figura 1.3.** Etapas fenológicas de la planta de cafeto según Morais *et al.* (2005).

De ellas se derivan las variedades tradicionales. En Costa Rica, a inicios del siglo pasado su cruzamiento natural dio como resultado el híbrido tico (H-33) llamado también Borbón salvadoreño, que tenía mayor productividad y buena calidad de taza. En esta época y por una mutación natural de la variedad Bourbon, se originaron las variedades Villa Sarchí, conocida también como La Luisa (en Alajuela, Costa Rica) y caturra (en Minas Gerais, Brasil), ambas de porte bajo (1.80 m de altura), entrenudos cortos y alta productividad, portadores de un gen de enanismo denominado “gen caturra” (Bertrand *et al.* 1999, Jiménez 2013, García 2015).

A mediados del siglo XX, otro cruce entre Typica y Bourbon, originado en Brasil, produjo la variedad Mundo Novo, de porte alto, entrenudos cortos y muy productiva. Esta variedad fue cruzada con la caturra (de granos amarillos) y se produjo la variedad catuaí, de porte medio (2.25m de altura), entrenudos cortos, hojas terminales verde tierno y excelente productor. Otras variedades importantes de la época fueron Villalobos, Pacas, San Ramón, Maragogipe y Nacional Salvadoreña (Bertrand *et al.* 1999, Jiménez 2013, García 2015).

Las variedades caturra y catuaí son las más cultivadas en Costa Rica, desde su difusión en los años setentas y ochentas. Se caracterizan por tener buena calidad y alta productividad, así como buena adaptación a la luminosidad. Pueden ser cultivadas con o sin sombra y en altas densidades, de 4 000 a 7 000 plantas por hectárea. Ninguna es resistente a la roya y son susceptibles a los nematodos presentes en la región y al CBD (Coffee Berry Disease) (Anthony *et al.* 1999, Jiménez 2013).

## **ii. Catimores, Sarchimores y variedades colombianas**

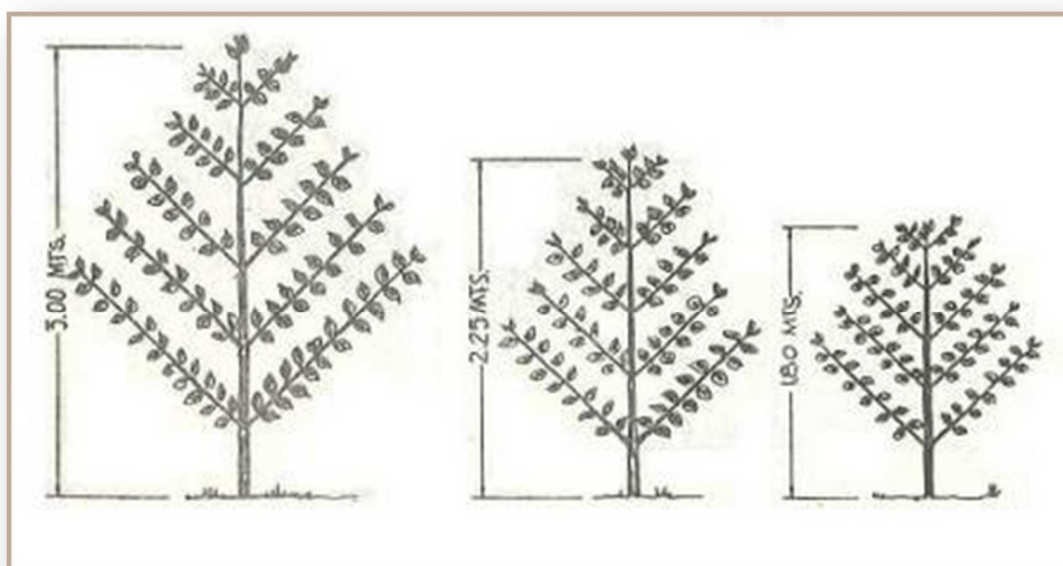
Estos grupos tienen su origen en el híbrido de Timor (HdT), cruzamiento natural de poblaciones de *C. arabica* y *C. canephora* originario de la isla de Timor, el cual a mediados del siglo pasado fue utilizado por el CIFIC<sup>1</sup> de Portugal, como fuente de genes de resistencia contra la roya (Anthony *et al.* 1999, Avelino *et al.* 1999).

Algunos autores consideran que el término Catimor es una denominación genérica dada a todos los genotipos y las poblaciones derivadas de ese cruce. Sin embargo, se distinguen tres

---

<sup>1</sup> CIFIC: Centro de Investigación en Roya de Cafeto. Ubicado en Oeiras, Portugal.

líneas de acuerdo a la población del híbrido de Timor utilizado: 1) Catimores: son el resultado del cruzamiento de la línea HdT CIFIC 832/1 con caturra CIFIC 19/1; 2) Sarchimores: resultado del cruzamiento de la línea HdT CIFIC 832/2 con Villa Sarchí CIFIC 971/10 y 3) Variedades colombianas o de castilla: cruce de la línea HdT CIFIC 1343 con caturra CCC 135 (Avelino *et al.* 1999, Jiménez 2013, Anzueto 2013).



**Figura 1.4.** Representación gráfica de los diferentes portes en las variedades comerciales tradicionales. Tomado de García (2015).

De cada línea, grupo u origen se derivaron distintas variedades, así dentro de los catimores se encuentran las variedades HW26, T-5175, T-5269, T-8667, Lempira, MIDA 96, IHCAFE-90 y Costa Rica 95. Las variedades H 361/4, LC 1669, IAPAR 59, T-5296, Parainema, Lapar 59, Tupí y Obatá son del grupo de los sarchimores; mientras que el último grupo es una multilínea denominada variedad castillo, cultivada casi exclusivamente en Colombia (Avelino *et al.* 1999, Jiménez 2013, Anzueto 2013).

Las variedades que derivan del HdT son resistentes a la roya anaranjada (*Hemileia vastatrix*), a algunas poblaciones de nematodos y a algunas cepas de CBD, debido a la “sangre canephora”. Precisamente, la búsqueda de nuevas variedades se debió a las enormes pérdidas provocadas en África por enfermedades como la roya y plagas como los gusanos blancos



del tronco (*Xylotrechus quadripes*) y la broca (*Hypothenemus hampei*), cuya rápida expansión durante la segunda mitad del siglo XIX hizo que la caficultura fuera aleatoria en algunos países como Ceilán, Indonesia e Isla Reunión (Anthony *et al.* 1999).

### **I.6 Requerimientos agroecológicos**

Para Costa Rica el área cafetalera se encuentra entre los 8°30' y los 10°30' latitud norte. La altitud adecuada para el cultivo de café se localiza entre los 500 y 1 700 msnm. La planta se adapta bien a suelos volcánicos y aluviales, y pueden utilizarse suelos con pendientes de hasta 45 por ciento, si son protegidos de la erosión. La temperatura promedio anual favorable está entre los 17 a 25°C, temperaturas superiores aceleran el crecimiento vegetativo pero limitan la floración; temperaturas inferiores a 10°C provocan clorosis y paralización del crecimiento de las hojas jóvenes. La cantidad y distribución de las lluvias durante el año son aspectos muy importantes, el rango ideal es entre 1 500 y 2 000 mm, con un mínimo de 145 días de precipitación y un máximo de 245. Con menos de 1 000 mm anuales se limita el crecimiento de la planta. Con precipitaciones mayores de 3 000 mm, la calidad física del café oro y la calidad de taza pueden verse afectadas, el manejo sanitario se torna difícil y costoso, ya que la humedad relativa puede alcanzar niveles superiores al 85%, lo que propicia el ataque de enfermedades fungosas (ICAFE 2011, Jiménez 2013).

El 80 % del café de mayor calidad se produce en las tierras altas, de los 1 000 a los 1 700 msnm y con temperaturas de 17 a 23 grados centígrados (ICAFE 2012).

### **I.7 Cultivo**

En Centroamérica el café se cultiva desde mitad del siglo XVIII, su expansión se dio en campos de labranza o pastizales y algunas veces bajo condiciones de sombrero (bosques primarios o secundarios) con el fin de reproducir su hábitat natural. Las primeras plantaciones comerciales en Costa Rica se establecieron posterior a la Independencia (1821) por terratenientes locales, campesinos e inmigrantes de varias partes del mundo (Samper 1999).

Ya en el siglo XX, a finales de la década de los setenta se empezó a implementar la siembra a pleno sol, debido a que en los años 1950 y 1960 se habían desarrollado variedades tolerantes a esta condición, que permitían una mayor densidad de plantas por hectárea y por ende mayor productividad. Esto provocó el desuso de la práctica cultural del sombrío, no sólo en Costa Rica, sino en muchas zonas cafetaleras del mundo. Después de la introducción de la roya en Centroamérica en el año 1976 se aceleró el uso de esta práctica<sup>2</sup> y para el año 1990 la mitad de las fincas productoras de café en América Latina habían cambiado su sistema de cultivo por café a pleno sol (Fournier 1988; Perfecto *et al.* 1996, Beer *et al.* 1998, Albertin y Nair 2004, DaMatta y Rodríguez 2007, Righi *et al.* 2008).

Sin embargo, la intensificación en la producción basada en variedades tolerantes al sol provocó consecuencias negativas, la planta se mantiene en condición de estrés debido a la sobreproducción de fruto, se incrementa el crecimiento de malezas y la aparición de plagas secundarias como *Planococcus citri* y los daños causados por *Cercospora coffeicola*; aumenta la erosión del suelo, disminuye el contenido de materia orgánica y se dan mayores problemas por ataque de nematodos. Esto hace que el productor esté sujeto a más riesgos y a una alta variabilidad de los costos de producción, lo que unido a la inestabilidad del precio del café en el mercado internacional, lo convirtió en un sistema poco sostenible ambiental y económicamente (Beer *et al.* 1998, Staver *et al.* 2001, DaMatta y Rodríguez 2007, Righi *et al.* 2008).

La disminución en los precios internacionales y el aumento en el “consumismo verde”, han causado un nuevo interés en el cultivo de café bajo sombra, con la ventaja de que puede ser comercializado como orgánico y vendido a un mejor precio que el café convencional cultivado a pleno sol (Albertin y Nair 2004). Los árboles de sombra generan ingresos adicionales por la producción de madera, leña y frutos. Además de las ventajas económicas, el sistema agroforestal permite mitigar los cambios provocados por el calentamiento global.

Se prevé que el incremento en la temperatura media anual en zonas con altitudes mayores a 1000 metros será en promedio de 2.2 °C, lo que influirá directa y negativamente en la calidad

---

<sup>2</sup> Avelino, J. 2015. La roya anaranjada del cafeto. CATIE/CIRAD/PROMECAFE. Comunicación personal.

del café de altura. Las condiciones de sombra permanentes pueden ser fundamentales para conservar la producción de café en estas zonas, ya que se pueden reducir las temperaturas entre 2 y 3 grados al mediodía. No obstante, se debe tomar en cuenta que los árboles pueden provocar sombreado excesivo, lo cual favorece el desarrollo del ojo de gallo (Staver *et al.* 2001, Avelino *et al.* 2007, DaMatta y Rodríguez 2007, ICAFE 2011, Montenegro 2011).

### I.8 Agroecosistema

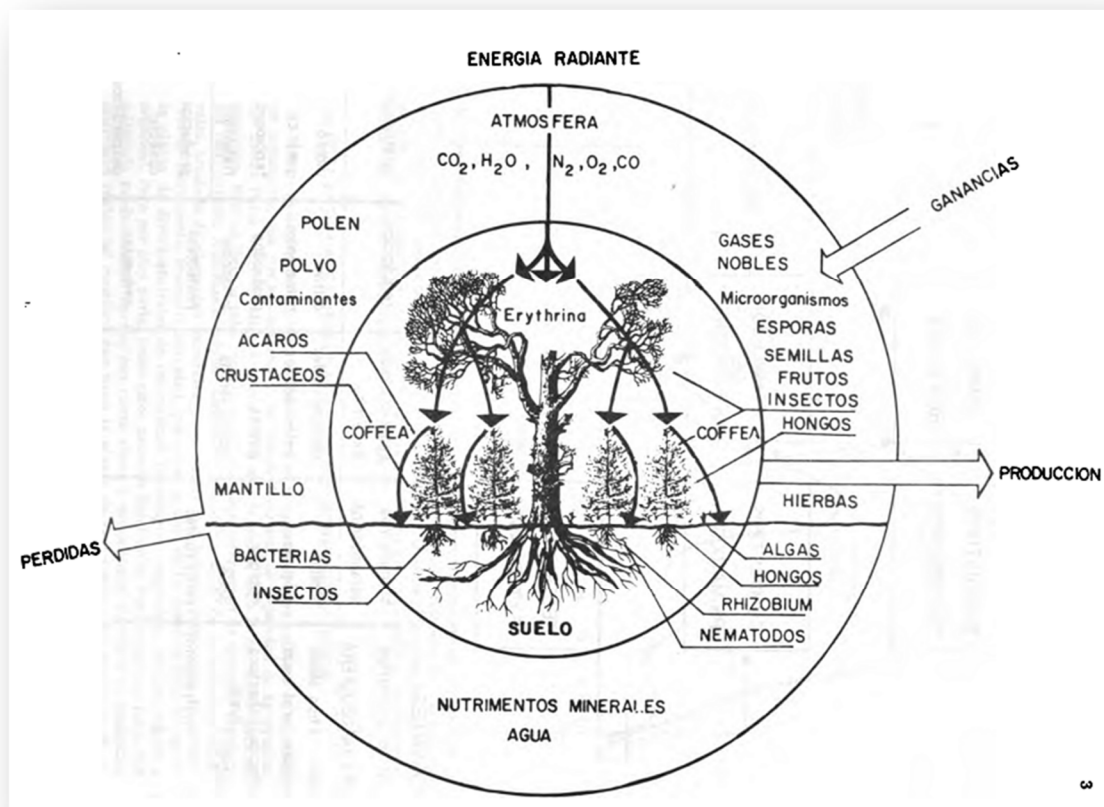
Para reducir las consecuencias de la variabilidad del clima, se deben utilizar prácticas agrícolas que toleran esta inestabilidad, para incrementar la capacidad de los agricultores de enfrentarla. En el cultivo de café una de las principales recomendaciones de los expertos es la adopción de patrones de caficultura sostenible, donde la reforestación y arborización de los cafetales juega un papel fundamental en la fijación de dióxido de carbono y en el mantenimiento de los acuíferos (ICAFE 2011).



**Figura 1.5.** Diagrama de diferentes sistemas de arborización de cafetales. A) Rústico, B) Policultivo tradicional, C) Policultivo comercial, D) Monocultivo con sombra y E) Monocultivo al sol. Modificado de Perfecto *et al.* (2007).

El asocio con árboles potencializa al cultivo de café como un sistema agroforestal que puede ofrecer servicios ecosistémicos, como la regulación hídrica, de gases y del clima, control de erosión por retención de sedimentos, formación de suelos, reciclaje de nutrientes, polinización, control biológico, mantenimiento de biodiversidad y belleza escénica (paisaje y territorio); permite además alta diversidad de vertebrados, invertebrados y plantas, los cuales tienen un papel determinante en el funcionamiento de los agroecosistemas de cafeto, ya que promueven la abundancia y diversidad de enemigos naturales que colaboran en la regulación de herbívoros, malezas y enfermedades, además de protección contra el viento (Muschler 1997, Perfecto *et al.* 2007, Virginio y Abarca 2008).

En los sistemas agroforestales, los árboles o arbustos de raíces profundas, aumentan la disponibilidad de los nutrientes a través de la fijación biológica y el reciclaje de nutrientes, aumentan la cantidad de materia orgánica, a través de hojarasca y residuos de poda, los cuales reducen el impacto de las gotas de la lluvia, la velocidad de escorrentía y la erosión, mejoran la estructura, el contenido de N y la retención de nutrientes en el suelo (Beer *et al.* 1998).



**Figura 1.6.** Esquema de un agrosistema cafetalero. Tomado de Fournier (1988).

Otros beneficios del asocio de café con árboles son mayor productividad, mayor cantidad y calidad de granos (mayor peso fresco), mejores propiedades organolépticas, mayor proporción de café pergamino oro, mejor estado vegetativo general de las plantas, menor incidencia de malezas, menores porcentajes de frutos chasparreados, quemados o momificados. También, se han reportado menores niveles de incidencia de roya y menores niveles poblacionales de *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. (Araya 1994, Samayoa y Sánchez 2000, Muschler 2001, Romero 2006). Asimismo, los árboles aportan ingresos económicos anexos por la venta de madera y frutos

Sin embargo, se debe tener precaución en el uso de la arborización en cafetales, ya que, si se usan especies incorrectas o en condiciones inadecuadas, los árboles pueden competir significativamente con el cafeto, pueden provocar sombreamiento excesivo o dificultades en

las operaciones de la cosecha (DaMatta y Rodríguez 2007), así como problemas con ojo de gallo (*Mycena citricolor*).

Se menciona que durante los 200 años que el café ha sido cultivado en Centroamérica, en los sistemas bajo sombra, las plagas y enfermedades se han mantenido en niveles bajos; a excepción del ojo de gallo el cual se ve favorecido por condiciones de largos períodos de mojadura foliar y elevada humedad relativa, ambiente que se acentúa en cultivos bajo sombrío (Samayoa y Sánchez 2000, Staver *et al.* 2001).

## **II. El patógeno y su ciclo**

El género *Mycena* comprende cerca de 150 especies y se registran más de 2 000 combinaciones si se toman en cuenta las variedades y formas especiales. Pertenece al grupo de los homobasidiomicetes con el himenóforo lamelado, al clado Euagarical y al taxa de los Agaricales. Es un grupo polifilético con miembros de los clados mycenaceae y adonis. Forma cuerpos fructíferos, solitarios o en grupos, pálidos de morfología diversa, con esporas amiloides en tejidos dextrinoides<sup>3</sup>. Casi todas son saprófitas, colonizadoras de madera u hojas, pueden desarrollarse en hojas y madera en descomposición, tanto en bosques como pasturas, muy pocas viven en humus. Algunas especies han sido descritas como micorrizas de orquídeas terrestres. Tienen la capacidad de degradar lignina y celulosa por lo que su función típica es la de causar pudriciones blancas de la madera. *M. galopus* es un descomponedor de hojas de roble, su micelio puede abarcar el 80% de la hojarasca en estos bosques y puede permanecer en la hojarasca hasta por dos años. Muchas especies tienen la capacidad de producir metabolitos antifúngicos como las estrobirulinas, lo que les permite desplazar a otros hongos (Hibbett y Thorn 2001, Moncalvo *et al.* 2002, Cannon y Kirk 2007, Webster y Weber 2007, Mycobank 2015).

Algunas especies saprófitas son acumuladoras de metales pesados y retenedoras de radionucleotidos del ambiente, como *M. polygramma* y *M. sanguinolenta*. Alrededor de 33 especies de *Mycena* han sido reportadas como biolumiscentes, se conoce que hay en total 42 especies de hongos que presentan este fenómeno, distribuidas en 9 géneros, todos

---

<sup>3</sup> Se refiere a la reacción del tejido al reactivo de Mezler, se torna marrón rojizo.

basidiomicetes, no se conoce de otro fitopatógeno que sea luminiscente (Buller y Vanterpool 1926, Weitz *et al.* 2001, Desjardin *et al.* 2007, Dighton *et al.* 2008, Baldrian 2010).

*M. citricolor* es considerada por Luttrell (1974) como un parásito hemibiótrofo y por Rayner *et al.* (1985) como un necrótrofo típico.

## II.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica actual, de acuerdo al Index Fungorum (2015) para el hongo *Mycena citricolor* (Berk. & M.A. Curtis) Sacc. es la siguiente: Mycenaceae, Agaricales, Agaricomycetidae, Agaricomycetes, Agaricomycotina, Basidiomycota, Fungi.

Este epíteto se encuentra registrado en Mycobank con el número 164943 y fue publicado por primera vez en 1887 por Saccardo, a partir del basiónimo *Agaricus citricolor* Berk. & M.A. Curtis (1868). Actualmente, se consideran sinónimos las siguientes combinaciones:

*Mycena flavida* (Maubl. & Rangel) Singer, Lilloa 22: 357 (1951) [1949]

*Omphalia citricolor* (Berk. & M.A. Curtis) Rick, Lilloa 2: 290 (1938)

*Mycena tricolor* Velen., České Houby 2: 303 (1920)

*Omphalopsis citricolor* (Berk. & M.A. Curtis) Murrill, N. Amer. Fl. (New York) 9(5): 316 (1916)

*Omphalia flavida* Maubl. & Rangel, Bull. Soc. mycol. Fr. 30: 46 (1914)

*Omphalia flavida* Maubl. & Rangel, Bull. Soc. mycol. Fr. 30: 46 (1914) var. *flavida*

*Sphaerostilbe flavida* Masee, Bull. Misc. Inf., Kew: 340 (1909)

*Agaricus citricolor* Berk. & M.A. Curtis, J. Linn. Soc., Bot. 10(no. 45): 285 (1868) [1869]

Para el estado anamórfico se consideran los siguientes nombres:

*Decapitatus flavidus* (Cooke) Redhead & Seifert, Redhead, Seifert, Vilgalys & Moncalvo, Taxon 49(4): 795 (2000)

*Stilbella flavidum* (Cooke) Henn., Bol. Mus. Paraense Emilio Goeldi, ser. Bot. 4: 413 (1904)

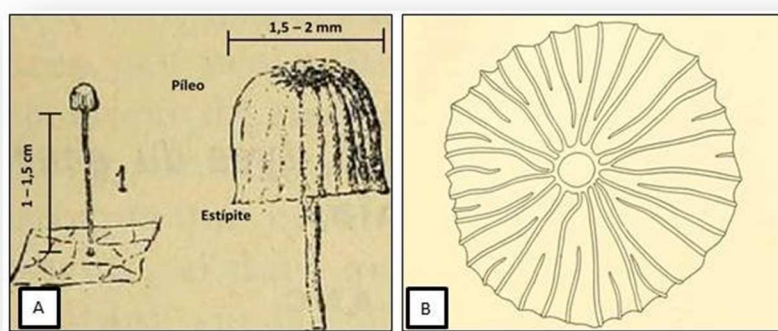
*Pistillaria flavida* (Cooke) Speg., Revta Fac. Agron. Vet. Univ. Nac. La Plata 2: 342 (1896)

*Stilbum flavidum* Cooke, Grevillea 9 (49): 11 (1880)

## II.2 Morfología

### iii. Estado teleomorfo

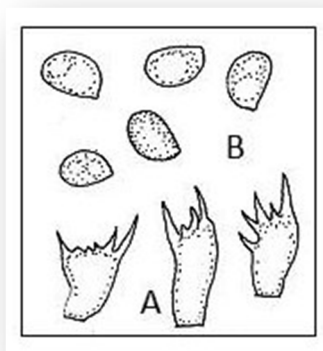
La descripción original realizada por Saccardo (1887) indica que es un hongo pequeño y delicado que posee un pileo de 5 mm, convexo, semitransparente y citrino; con estípite de 6 mm, largo y filiforme, glabro y con algunas lamelas decurrentes. De hábito gregario y presente en hojas muertas. El espécimen descrito fue colectado en Cuba y Centroamérica. De acuerdo a Maublanc y Rangel (1914), el basidiocarpo es diminuto y amarillento. El estípite es delgado, aterciopelado, recto y setiforme, de 1 a 1,5 cm de largo.



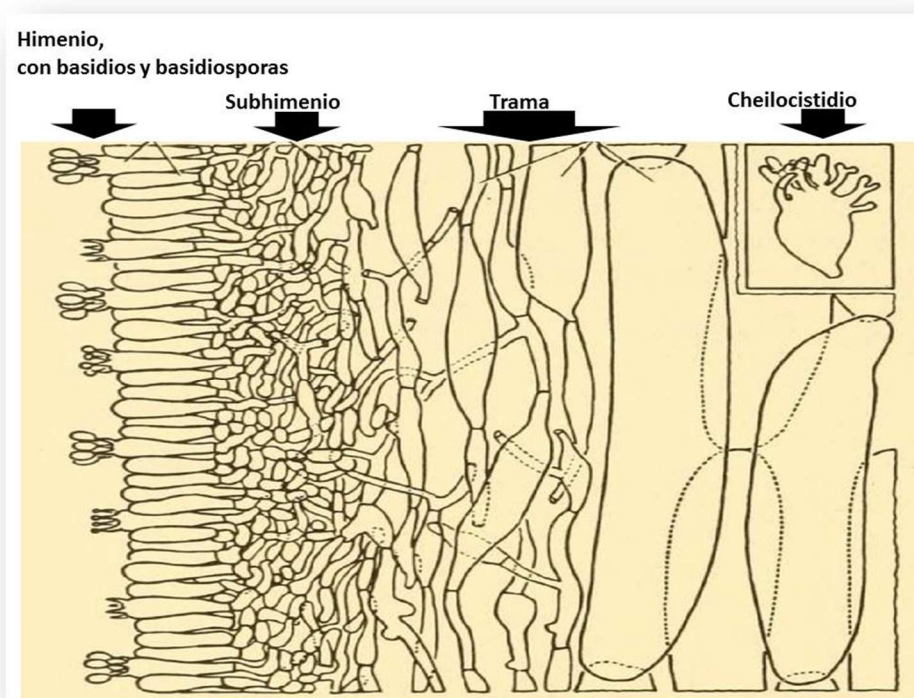
**Figura 1.7.** A) Ilustración de las dimensiones del basidiocarpo de *Mycena citricolor*. B) Vista de la parte inferior de un píleo extendido de *Mycena citricolor*, para mostrar disposición de las laminillas. A. Modificada de Mounblac y Rangel (1914). B. Tomada de Buller (1958).

El píleo delgado y membranoso, hemisférico-campanulado, deprimido o subumbilicado en el centro, medianamente aplanado, glabro y radialmente estriado, de 1,5 a 2,5 mm de diámetro. Con pocas laminillas, distantes, triangulares, atenuadas al final, algo cerosas, más o menos decurrente. El borde de las laminillas es estéril y lleno de cheilocistidios piriformes o clavados.



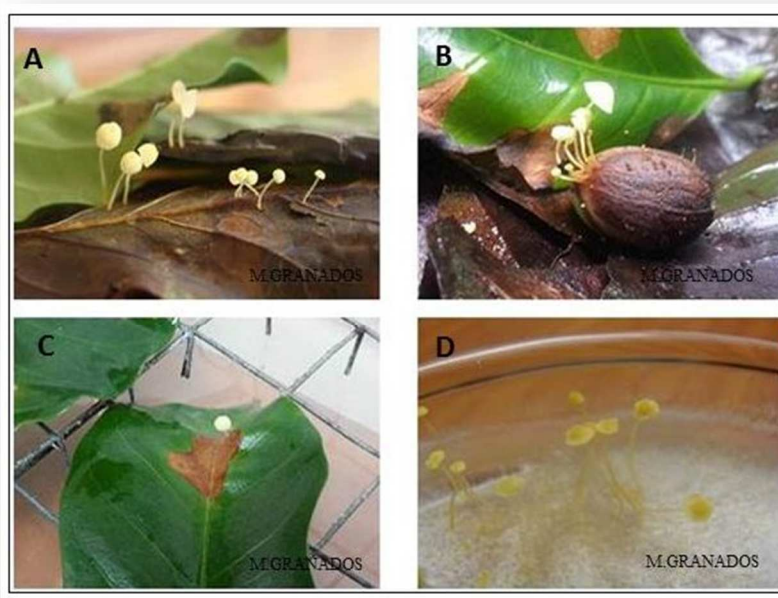


**Figura 1.8.** A) Cheilocistidios y B) Basidiosporas de *Mycena citricolor*. Tomado de Pegler (1987).



**Figura 1.9.** Vista longitudinal de una laminilla de *Mycena citricolor*. Tomado de Buller (1958).

Los basidios son clavados de 14,0 a 17,4 X 5,0  $\mu\text{m}$ ; las basidiosporas son hialinas de 4,0-5,0 X 2,5-3,0  $\mu\text{m}$  elipsoides a ovóides, apiculadas y con gútula, débilmente amiloides (Buller 1958, Pegler 1987).



**Figura 1.10.** Basidios. **A)** y **B)** Basidiocarpos desarrollados de material de campo. **C)** y **D)** Basidiocarpos producidos en laboratorio, **C:** a partir de lesión joven colectada en la época seca, **D:** producidos *in vitro*.

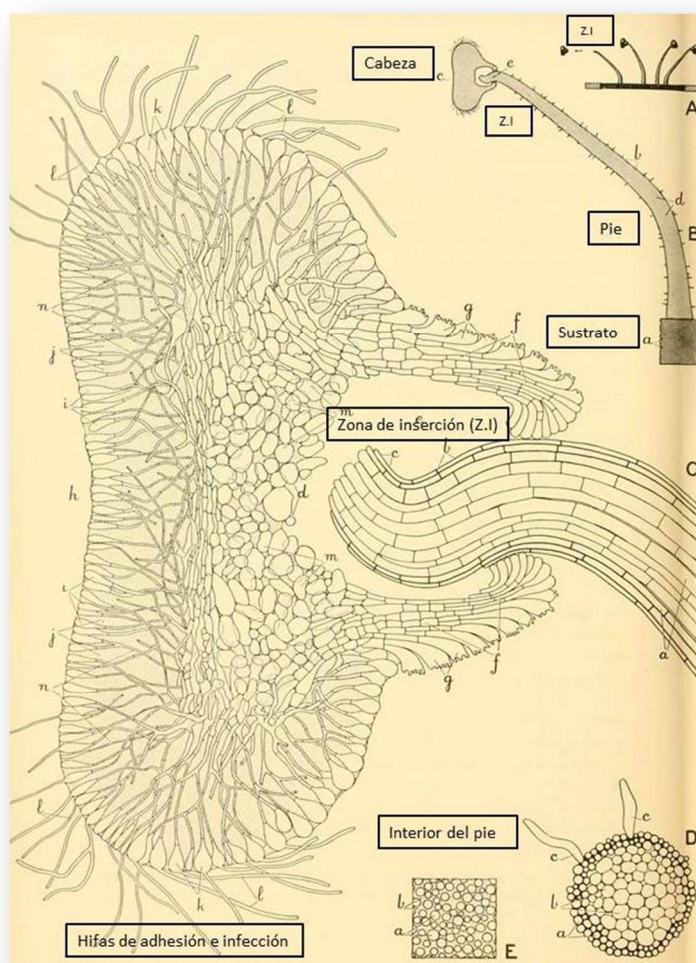
#### iv. Estado anamorfo

Estructura amarilla brillante en forma de alfiler, que consiste de un pie y una cabeza. El pie o pedicelo es sólido, cilíndrico y delgado, de aproximadamente 2 mm de altura con 0,12 mm de diámetro en su parte basal y 0,05 mm de diámetro en la zona de inserción de la cabeza (Buller 1958).

La cabeza o gema es esferoide y achatada en los polos de apariencia cerosa, dura y coriacea, con una lámina de mucílago en su exterior lo que le permite que aunque se deseeque no pierda su forma original. Presenta una pequeña apófisis en la base, de alrededor 0,06 mm de diámetro, que permite la inserción de aproximadamente 0,10 mm del extremo distal del pie (Buller 1958).

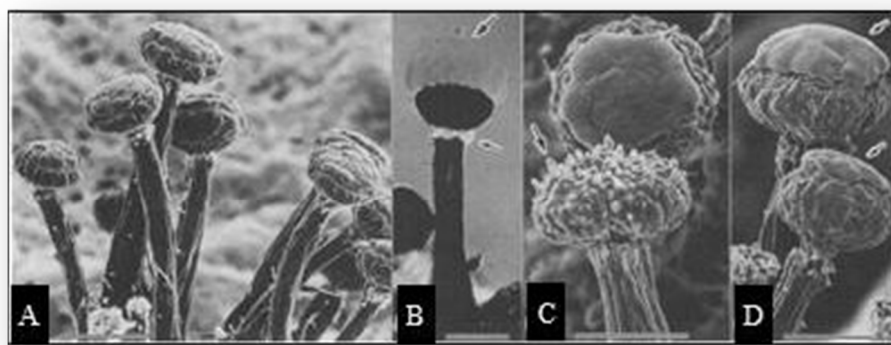


**Figura 1.11.** Geminíferos de *Mycena citricolor*.



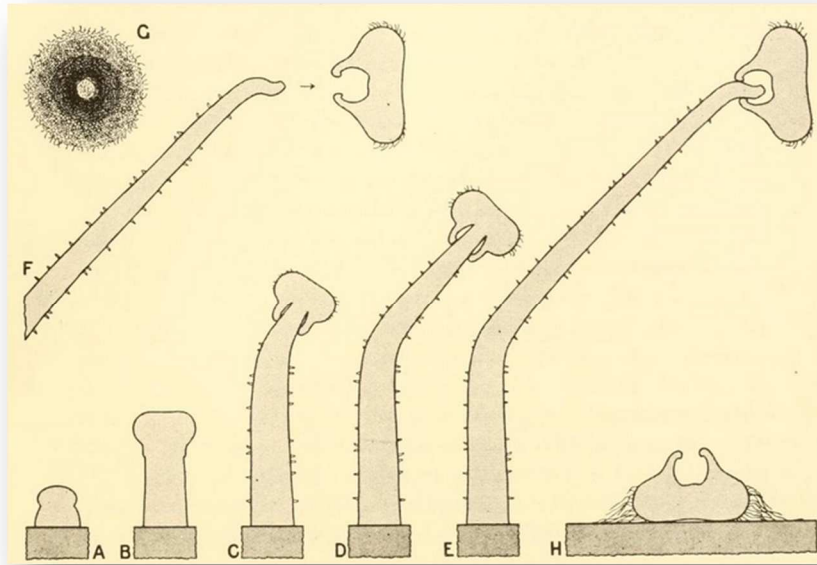
**Figura 1.12.** Ilustración del geminífero de *Mycena citricolor* mostrando todas sus partes. Modificado de Buller (1958).

Redhead *et al.* (2000) la describen como un píleo modificado y dehiscente que actúa como propágulo, muy similar a la estrategia de *Tretopileus*, un Aphyllophoral que produce bulbillos; sin embargo, estos son fuertemente melanizados y regeneran su cabeza constantemente.

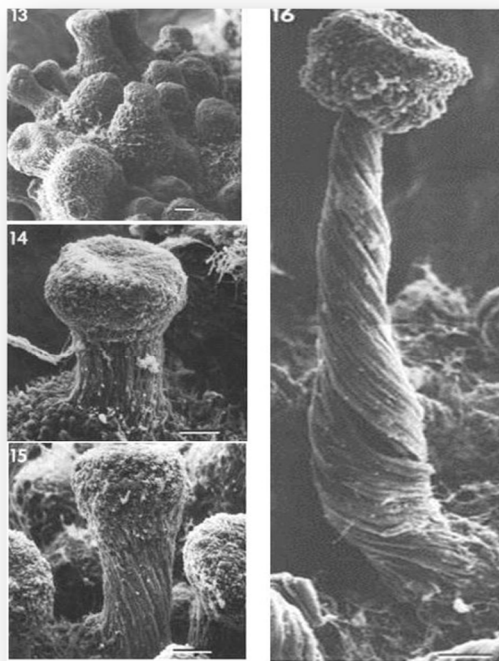


**Figura 1.13.** Sinemas de *Tretopileus sphaerophorus*. **A)** Sinemas maduros produciendo bulbillos, **B)** Mucus entre estípite y bulbillo, **C)** y **D)** Bulbillos. Escala A, C y D: 50  $\mu\text{m}$ , B: 100  $\mu\text{m}$ . Modificado de Okada *et al.* (1998).

Cuando la cabeza está completamente desarrollada se desprende con facilidad. Mide entre 0,35 y 0,40 mm de diámetro, presenta un leve hundimiento en la zona central y posee hifas de adhesión en los polos que la hacen ver, con aumento de 40X, de apariencia lanosa. Esta estructura nunca produce conidios ni externa ni internamente (Buller 1958).



**Figura 1.14.** Ilustración de las fases de desarrollo del geminífero de *Mycena citricolor*. Tomado de Buller (1958).



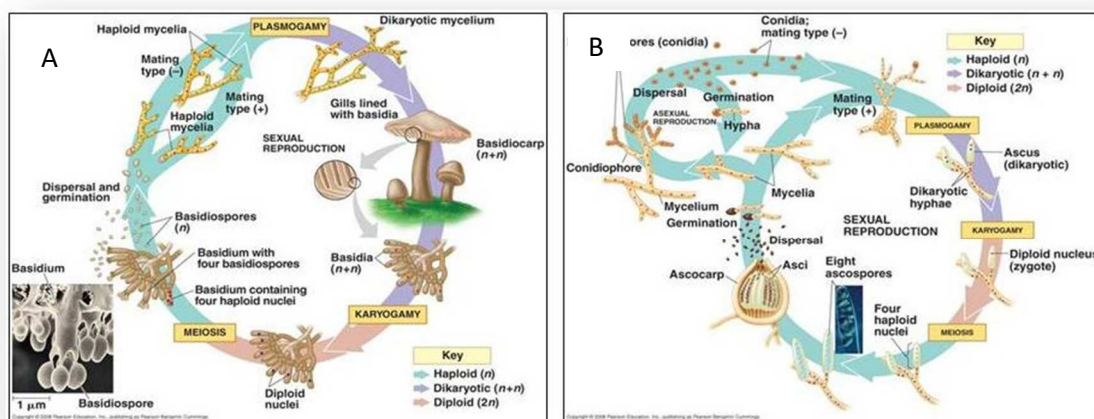
**Figura 1.15.** Micrografía electrónica de barrido de los geminíferos de *Mycena citricolor*. Escala: 13 y 16:100µm, 14 y 15: 50 µm. Tomado de Cole (1987).



## II.3 Ciclo de vida

Los basidiomicetes, al igual que los otros grupos de hongos, presentan dos fases de reproducción, la sexual y la asexual. La primera constituye la mayor parte del ciclo y se caracteriza por la formación de cuerpos fructíferos complejos llamados basidiomas o basidiocarpos. En hymenomicetes, es particularmente interesante, ya que el tamaño y complejidad de las estructuras es mucho mayor que la de otros grupos de hongos. El proceso consta de 5 fases : 1) iniciación de los primordios, 2) formación de células y división de núcleos debido a la formación de paredes transversales, 3) diferenciación de células de acuerdo a su localización, 4) aumento del tamaño celular y 5) formación de plecténquima y tejido del bulbo. La asexual, pocas veces presenta fase conidial (artroconidios o blastoconidios), siendo que las clamidosporas y los esclerocios son las estructuras más comúnmente formadas, algunas especies producen bulbillos (Reijnders y Moore 1985, Webster y Weber 2007).

Wolf y Wolf (1947) mencionó que algunos hymenomicetes producen gemas, siendo el más llamativo de estos *Omphalia flavida*.



**Figura 1.16.** Comparación de los ciclos de vida de un hongo basidiomicete (A) y uno ascomicete (B). Tomado de [http://science.kennesaw.edu/~jdirnber/Bio2108/Lecture/LecBiodiversity/31\\_Labeled\\_Images/](http://science.kennesaw.edu/~jdirnber/Bio2108/Lecture/LecBiodiversity/31_Labeled_Images/)

Se debe tener especial cuidado con el término “gema”, ya que desde el punto de vista morfológico una gema está definida como una clamidospora especializada, que se desarrolla

a partir de micelio vegetativo, nace terminalmente, solitaria o en cadenas, y al estar madura se separa del micelio y sirve como estructura de dispersión en organismos acuáticos, como *Saprolegnia* sp. (Protista, Oomycota) (Gupta 2004, Webster y Weber 2007).

La palabra “gema” y “geminífero” en el caso de *M. citricolor* fue adoptado por Buller (1958) para describir la fase asexual de *M. citricolor*.

Redhead *et al.* (2000) mencionan que hay algunos basidiomicetes en los que es confuso determinar sus fases, ya que lo considerado como fase anamórfica es ontogénicamente un basidioma modificado, como en los casos de *Rhacophyllus*, *Tilachlidiopsis*, *Asterophora* y *M. citricolor*, para los cuales se ha generado mucha controversia taxonómica y han sido renombrados varias veces tratando de ubicarlos en un morfo específico (teleomorfo o anamorfo). La duda que surge respecto a estos agaricales es, si realmente producen un estado anamórfico o si presentan dos morfos sexuales.

Por ejemplo, la forma típica (la más común en la naturaleza) de *Rhacophyllus* es un basidioma similar a un agarical con pequeñas laminillas en las que se desarrollan estructuras parecidas a esclerocios, llamados lisómeros o bulbillos y que son homólogos a basidios; *R. lilacinus* puede formar algunas veces un basidioma normal, aunque con pocas basidiosporas, por lo que se le atribuyó un estado perfecto, *Coprinus clastophyllus*. Se ha visto que la fase típica puede producir “basidiosporas” y que en cultivo puede crecer presentando las dos fases.

En el caso de *Tilachlidiopsis* anamorfo de *Dendrocollybia* se producen estípites que pueden o no desarrollar píleo, situación similar a *Asterophora* la cual en un solo tipo de basidioma, puede formar o no laminillas; de esta forma, si el basidioma las produce es considerado un morfo sexual y si no las produce se considera estado anamorfo (género pleiomorfo), esto dependiendo de la expresión de genes específicos en un momento dado.

Con respecto a *M. citricolor*, este produce dos tipos de estructuras tipo píleo, una estéril y otra fértil, con completa diferenciación entre el basidioma normal y el anamorfo. Estos autores, argumentan que el estado anamórfico no cuenta con las características asexuales de los Heterobasidiomicetes como para ser considerado un *Stilbum* y que no produce masas de

conidios en un sinema como para ser calificado *Stilbella*, por lo que describen el género *Decapitatus* por primera vez, con la especie tipo *flavidus* como anamorfo de *M. citricolor*.

Estos autores concluyen también que esta divergencia morfológica se debe a un proceso evolutivo que aún está tomando lugar. A lo que previamente, Reijnders y Moore (1985) mencionaban que ciertas anomalías en Agaricales son causadas por desórdenes en la actividad del genoma.

Con respecto al ciclo específico de *M. citricolor*, Puttemans (1904) y Buller (1958) estudiaron detalladamente el estado asexual, mientras que Maublanc y Rangel (1914) fueron los primeros en asociarlo con la fase teleomórfica. Carvajal (1939a) fue el primero en documentar la relación de la fase teleomórfica con la anamórfica en condiciones de campo.

Los basidiocarpos pueden ser observados en hojas de diferentes especies vegetales caídas y en descomposición sobre el suelo, tanto en el bosque como en cultivos de cafeto; mientras que los geminíferos se presentan sobre lesiones en hojas adheridas a la planta. El teleomorfo se puede recuperar a partir de hojas de cafeto infectadas y mantenidas bajo condiciones de alta humedad y a partir de inoculaciones artificiales en hojas de café, *Bryophyllum calycinum*, *Nerium oleander*, *Eriobotrya japonica* y algunas especies de *Ficus* (Carvajal 1939a, Dennis 1950, Buller 1958).

El hongo es normalmente heterotálico, cada basidiospora germina y produce un micelio primario sin fíbulas. En algunos casos de cultivos monospóricos se forma esporádicamente micelio dicariótico con conexiones (Sequeira 1952 citado por Salas y Hancock, 1972).

El hongo puede ser cultivado *in vitro* y se pueden obtener ambos morfos a partir del mismo micelio, algunos de los medios de cultivos en los que se ha desarrollado son, agar- pan-agua, agar- harina de maíz, agar-harina de avena, papa-dextrosa-agar, agar-semilla de millo, agar-semilla de arroz descascarillada y papa-dextrosa-agar con 2% de levadura. Se requiere de almidón, maltosa, sacarosa y glucosa como fuentes de carbono, de peptona como fuente de nitrógeno y de las vitaminas tiamina HCl, riboflavina, hidrocloreto de piridoxina y pentonato de calcio para un óptimo desarrollo miceliar (Buller 1958, Sequeira 1952 citado por Salas y Hancock 1972, Sequeira 1954, Salas y Hancock, 1972, Wang 1988).



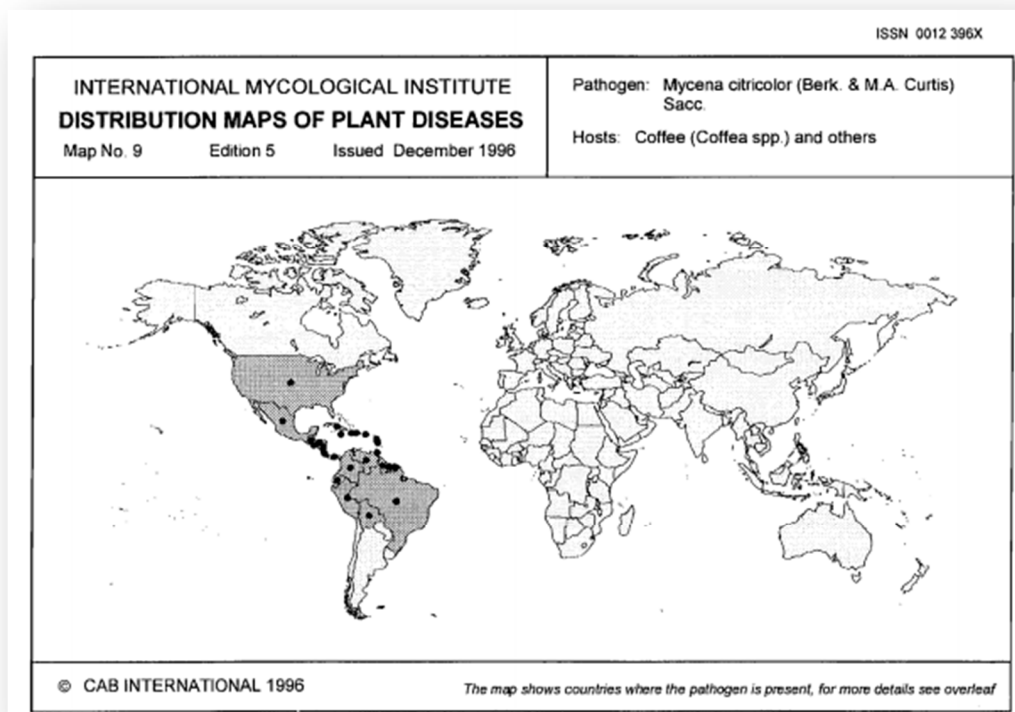
El micelio en medio de cultivo es blanco, puede presentar patrón de crecimiento anillado, ramificado o algodonoso. El crecimiento aéreo de las hifas es escaso, la mayoría de las veces presenta un diámetro superior a 6 cm en 7 días de crecimiento. Algunos aislamientos presentan colonias lisas, casi traslúcidas y de desarrollo lento. La temperatura óptima de crecimiento es 21°C, aunque crece bien a 25°C (Wang 1988, López 2001, García 2012).

La producción del estado perfecto en cultivo artificial es baja o nula en muchos aislamientos, pero puede ser aumentada al exponerlos a la luz ó co-cultivarlos con *P. oxalicum*, *P. palitans*, *P. cyclopium*, *P. brevi-compaetum*, *P. viridicatum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. y *Phycomyces blakesleanus*, lo que indica que la producción es dependiente de la actividad de hongos saprófitos. Los basidiocarpos se forman cerca de la zona de contacto de los hongos y en la mayoría de los casos, producen abundantes basidiosporas con 90 a 95% de viabilidad y poca variabilidad entre aislamientos. Estas inician germinación a las 24 a 36 horas de ser colocadas en agar-agua (Salas y Hancock 1972, Wang 1988).

La producción de gemas también es estimulada por la luz y requiere la presencia de tiamina-HCl, es afectada por las concentraciones de L- triptófano, L-valina y L-aspergina, pero no por la presencia de otros hongos en cultivo. Algunos cultivos no son capaces de producir gemas aunque cuenten con los requerimientos señalados (Sequeira 1952, Buller 1958, Echandi y Echandi 1958, Wang 1988).

#### **II.4 Distribución geográfica**

De acuerdo a las dos últimas ediciones (4ta y 5ta) de los mapas de distribución de enfermedades, elaboradas por el International Mycological Institute y publicadas por el CAB International en 1975 y 1996, respectivamente, este hongo se encuentra presente en los siguientes países: Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Dominica, República Dominicana, Ecuador, El Salvador, Guinea Francesa, Guadalupe, Guatemala, Guyana, Haití, Honduras, Jamaica, Martinica, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Puerto Rico, Surinam, Trinidad y Tobago, Estados Unidos (Florida) y Venezuela. Aunque, desde 1914 la Comisión de Agricultura de las Indias Occidentales registró la presencia de *Omphalia flavida* en Antillas/Bahamas.



**Figura 1.17.** Mapa de distribución mundial del hongo *Mycena citricolor* al año 1996. Tomado de CAB International (1996).

Si bien su distribución se considera netamente americana, el nuevo mapa de distribución publicado por el CABI reporta 3 registros del patógeno en Francia (Plantwise Knowledge Bank 2015). La fuente no especifica la región de Francia, podría referirse a las islas Martinica y Guadalupe, que son departamentos franceses en el Caribe.

Además, Lentz *et al.* (1975) lo reportan en la Unión Soviética y Zhishu *et al.* (1993) lo registran en la provincia de Guangdong en China.



afecta ambos procesos, estando el óptimo para luminiscencia de 4 a 6 y para crecimiento en 4 (Buller 1958, Weitz *et al.* 2001, Weitz *et al.* 2002).

La luminiscencia ocurre generalmente en los basidiomas. Ecológicamente, se interpreta como una adaptación para aumentar la dispersión de las esporas, por lo que generalmente el micelio no emite luz; excepto por *M. citricolor*, en el cual, tanto el micelio como los propágulos son luminosos. Se piensa que atrae vectores de dispersión como artrópodos. La luminiscencia puede servir como una señal de alerta para repeler fungívoros nocturnos o bien atraer depredadores o parasitoides de estos fungívoros. Este fenómeno puede estar relacionado con el metabolismo de la degradación de lignina, funcionando como un sistema de detoxificación de peróxidos formados durante la ligninólisis, por lo que sería solamente una vía metabólica sin significado ecológico (Bermudes 1990, Desjardin *et al.* 2007, Desjardin *et al.* 2008, Seas-Carvajal y Avalos 2013).

## II.6 Hospederos

Se conoce que *Mycena citricolor* puede atacar alrededor de 219 hospederos en 80 familias de plantas. A continuación se muestran las familias y especies reportadas como hospederas, así como la referencia bibliográfica.

Los nombres científicos fueron anotados tal y como aparecen en la referencia, cuando se citaba solo el binomio se completó con la familia correspondiente, en los casos que fue posible.

Es probable que algunos nombres científicos hayan cambiado, por lo que, en algunos casos puede ser que se trate de la misma planta anotada varias veces.

**Cuadro 1.** Listado de las especies de plantas reportadas como hospederas de *M. citricolor*.

Familia	Especie	Referencia
Adoxaceae	<i>Sambucus mexicana</i>	Carvajal 1939b
Agavaceae	<i>Yucca</i> spp.	Pacheco 2012
Amaranthaceae	<i>Achyranthes aspera</i>	Sequeira 1958
Amaranthaceae	<i>Achyranthes indica</i>	Sequeira 1958
Amaranthaceae	<i>Amaranthaceae</i>	Sequeira 1958
Amaranthaceae	<i>Iresine celosía</i>	Sequeira 1958
Amaranthaceae	<i>Iresine</i> spp.	Carvajal 1939b
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i>	Carvajal 1939b
Anacardiaceae	<i>Spondia purpurea</i>	Carvajal 1939b
Annonaceae	<i>Annona chirimola</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958

Annonaceae	<i>Annona reticulata</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Apocynaceae	<i>Nerium oleander</i>	Sequeira 1958
Aracaceae	<i>Xanthosoma</i> sp.	Sequeira 1958, De la Iglesia y Cascaret 2000
Araceae	<i>Anthurium myosuroides</i>	Sequeira 1958
Araceae	<i>Caladium</i> sp.	Sequeira 1958
Araceae	<i>Colocasia esculenta</i>	Pacheco 2012
Araceae	<i>Monstera pittieri</i>	Sequeira 1958
Araceae	<i>Monstera</i> sp.	Sequeira 1958
Araceae	<i>Philodendron</i> sp.	Sequeira 1958
Araceae	<i>Philodendron tripartitum</i>	Sequeira 1958
Araceae	<i>Syngonium</i> spp.	Carvajal 1939b
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	Carvajal 1939b
Asteraceae	<i>Chaptalia nutans</i>	Sequeira 1958
Asteraceae	<i>Chromolaena odorata</i> .	Pacheco 2012
Asteraceae	<i>Dahlia</i> spp.	Carvajal 1939b
Asteraceae	<i>Elephantopus mollis</i>	Sequeira 1958
Asteraceae	<i>Galinsoga parviflora</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Asteraceae	<i>Jaegeria hirta</i>	Carvajal 1939b
Asteraceae	<i>Lactuca</i> sp.	Sequeira 1958
Asteraceae	<i>Podachaenium eminens</i>	Carvajal 1939b
Asteraceae	<i>Pseudelephantopus spicatus</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Asteraceae	<i>Sonchus oleraceus</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Asteraceae	<i>Synedrella nodiflora</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Asteraceae	<i>Tridax procumbens</i>	Sequeira 1958
Asteraceae	<i>Vernonia cinerea</i>	Carvajal 1939b
Balsaminaceae	<i>Ipatiens sultani</i>	Carvajal 1939b
Begoniaceae	<i>Begonia involucrata</i>	Sequeira 1958
Begoniaceae	<i>Begonia</i> sp.	Carvajal 1939b
Bignoniaceae	<i>Pithecoctenium echinatum</i>	Carvajal 1939b
Bixaceae	<i>Bixa orellana</i>	Carvajal 1939b
Bromeliaceae	<i>Guzmania</i> sp.	Sequeira 1958
Cannaceae	<i>Canna edulis</i>	Sequeira 1958
Cannaceae	<i>Canna indica</i>	Carvajal 1939b, Pacheco 2012
Caryophyllaceae	<i>Arenaria lanuginosa</i>	Sequeira 1958
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Commelinaceae	<i>Campelia zanonii</i>	Urtiaga 1986 por De la Iglesia y Cascaret 2000
Commelinaceae	<i>Commelina coelestis</i>	Pacheco 2012
Commelinaceae	<i>Commelina diffusa</i>	Sequeira 1958, Pacheco 2012
Commelinaceae	<i>Commelina elegans</i>	Sequeira 1958
Commelinaceae	<i>Commelina erecta</i>	Pacheco 2012
Commelinaceae	<i>Commelina longicaulis</i>	Urtiaga 1986 por De la Iglesia y Cascaret 2000
Commelinaceae	<i>Tradescantia crassifolia</i>	Pacheco 2012
Commelinaceae	<i>Tradescantia cumanensis</i>	Sequeira 1958
Compositae	<i>Ageratum houstonianum</i>	Pacheco 2012
Compositae	<i>Eupatorium odoratum</i>	Pacheco 2012
Compositae	<i>Galinsoga quadriradiata</i>	Pacheco 2012
Compositae	<i>Melampodium divaricatum</i>	Pacheco 2012
Compositae	<i>Tithonia tubiformis</i>	Pacheco 2012
Convolvulaceae	<i>Calonyction aculeatum</i>	Sequeira 1958
Convolvulaceae	<i>Calonyction aculeatum</i>	Sequeira 1958
Convolvulaceae	<i>Ipomoea purpurea</i>	Pacheco 2012
Convolvulaceae	<i>Ipomoea</i> sp.	Sequeira 1958
Convolvulaceae	<i>Ipomoea tilisia</i>	Carvajal 1939b
Convolvulaceae	<i>Ipomoea triloba</i>	Sequeira 1958
Convolvulaceae	<i>Quamoclit coccinea</i>	Sequeira 1958
Costaceae	<i>Costus</i> sp.	Carvajal 1939b

Crassulacea	<i>Bryophyllum calycinum</i>	Sequeira 1958
Crassulacea	<i>Bryophyllum pinnatum</i>	Carvajal 1939b
Crassulacea	<i>Kalanchoe pinnata</i>	De la Iglesia y Cascaret 2000
Cucurbitaceae	<i>Cayaponia americana</i>	Sequeira 1958
Cucurbitaceae	<i>Cayaponia attenuata</i>	Sequeira 1958
Cucurbitaceae	<i>Chayota edulis</i>	Carvajal 1939b
Cucurbitaceae	<i>Cucutbita</i> sp.	Carvajal 1939b
Cucurbitaceae	<i>Echinocystis coulteri</i>	Sequeira 1958
Cucurbitaceae	<i>Elateriopsis oerstedii</i>	Sequeira 1958
Cucurbitaceae	<i>Gurania costaricensis</i>	Sequeira 1958
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i>	Sequeira 1958
Cucurbitaceae	<i>Cyclanthera pittieri</i>	Carvajal 1939b
Cyperaceae	<i>Scleria melaleuca</i>	Sequeira 1958
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea convolvulacea</i>	Sequeira 1958
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea macrostachya</i>	Sequeira 1958
Eloecarpaceae	<i>Sloanea curatellifolia</i>	De la Iglesia y Cascaret 2000
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum coca</i>	Lentz et al. 1975
Euphorbiaceae	<i>Acalypha macrostachya</i>	Sequeira 1958
Euphorbiaceae	<i>Codiaeum variegatum</i>	Pacheco 2012
Euphorbiaceae	<i>Croton</i> sp.	Carvajal 1939b
Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Euphorbiaceae	<i>Sapium</i> sp.	Carvajal 1939b
Euphorbiaceae	<i>Synadenium grantii</i>	Carvajal 1939b
Fabaceae	<i>Arachis pintoii</i>	Pacheco 2012
Fabaceae	<i>Cassia basillaris</i>	Carvajal 1939b
Fabaceae	<i>Desmodium canum</i>	De la Iglesia y Cascaret 2000
Fabaceae	<i>Erythrina</i> spp.	Carvajal 1939b
Fabaceae	<i>Hymenaea courbaril</i>	Carvajal 1939b
Fabaceae	<i>Ingas</i> spp.	Carvajal 1939b, Pacheco 2012
Fabaceae	<i>Meibomia</i>	Carvajal 1939b
Fabaceae	<i>Mucuna andreana</i>	Carvajal 1939b
Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Carvajal 1939b
Fabaceae	<i>Teramnus uncinatus</i>	De la Iglesia y Cascaret 2000
Fabaceae	<i>Trifolium repens</i>	Pacheco 2012
Fitolacaceae	<i>Petiveria alliaceae</i>	De la Iglesia y Cascaret 2000
Geraniaceae	<i>Pelargonium</i> sp.	Carvajal 1939b
Gesneriaceae	<i>Alloplectus tetragonus</i>	Sequeira 1958
Labiatae	<i>Coleus blumei</i>	Sequeira 1958
Labiatae	<i>Hyptis pectinata</i>	Sequeira 1958
Lamiaceae	<i>Cornuta grandifolia</i>	Carvajal 1939b
Lamiaceae	<i>Hyptis villi</i>	Urtiaga 1986 por De la Iglesia y Cascaret 2000
Lamiaceae	<i>Leonorus sibiricus</i>	Carvajal 1939b
Lamiaceae	<i>Salvia costarricensis</i>	Carvajal 1939b
Lamiaceae	<i>Salvia</i> sp.	Carvajal 1939b
Laureaceae	<i>Ocotea coruna</i>	Sequeira 1958
Laureaceae	<i>Persea americana</i>	Sequeira 1958, Pacheco 2012
Laureaceae	<i>Persea caerulea</i>	Sequeira 1958
Laureaceae	<i>Phoebe mexicana</i>	Carvajal 1939b
Leguminosae	<i>Cassia bacillaris</i>	Sequeira 1958
Leguminosae	<i>Desmodium affine</i>	Sequeira 1958
Leguminosae	<i>Desmodium incanum</i>	Sequeira 1958
Leguminosae	<i>Desmodium triflorum</i>	Sequeira 1958
Leguminosae	<i>Glycine soja</i>	Sequeira 1958
Leguminosae	<i>Inga marginata</i>	Sequeira 1958
Leguminosae	<i>Inga paterno</i>	Sequeira 1958
Liliaceae	<i>Smilax angustifolia</i>	Sequeira 1958

Lorantaceae	<i>Phthirusa aff. paniculata</i>	Urtiaga 1986 por De la Iglesia y Cascaret 2000
Malpighiaceae	<i>Byrsonina crasifolia</i>	Carvajal 1939b
Malpighiaceae	<i>Malpighia glabra</i>	Carvajal 1939b
Malvaceae	<i>Pavonia typhoba</i>	Urtiaga 1986 por De la Iglesia y Cascaret 2000
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	Carvajal 1939b
Malvaceae	<i>Theobroma cacao</i>	Plantwise Knowledge Bank 2015
Malvaceae	<i>Triunfetta semitriloba</i>	Carvajal 1939b
Marantaceae	<i>Calathea warscewiczii</i>	Sequeira 1958
Marantaceae	<i>Maranta arundinacea</i>	Sequeira 1958
Melastomaceae	<i>Miconia micrantha</i>	Carvajal 1939b
Melastomaceae	<i>Miconia</i> sp.	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Meliaceae	<i>Guarea trichilioides</i>	De la Iglesia y Cascaret 2000
Menispermaceae	<i>Cissampelos pareira</i>	Pacheco 2012
Moraceae	<i>Ficus donnell-smithii</i>	Sequeira 1958
Moraceae	<i>Ficus</i> sp.	Sequeira 1958
Moraceae	<i>Morus alba</i>	Sequeira 1958
Musaceae	<i>Musa</i> sp.	Carvajal 1939b
Myrtaceae	<i>Eugenia jambos</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> sp.	Sequeira 1958
Myrtaceae	<i>Psidium guajaba</i>	Carvajal 1939b
Myrtaceae	<i>Psidium guineensi</i>	Carvajal 1939b
Myrtaceae	<i>Syzygium jambos</i>	Pacheco 2012, De la Iglesia y Cascaret 2000
Oleaceae	<i>Fraxinus americana</i>	Sequeira 1958
Oxalidaceae	<i>Oxalis martiana</i>	Sequeira 1958
Passifloraceae	<i>Passiflora coriacea</i>	Sequeira 1958
Passifloraceae	<i>Passiflora costaricensis</i>	Sequeira 1958
Passifloraceae	<i>Passiflora ligularis</i>	Carvajal 1939b
Passifloraceae	<i>Passiflora</i> spp.	Carvajal 1939b
Phoradendraceae	<i>Phoradendrum</i> spp.	Carvajal 1939b
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca rugosa</i>	Sequeira 1958
Phytolaccaceae	<i>Rivina humilis</i>	Sequeira 1958
Piperaceae	<i>Peperomia</i> sp.	Carvajal 1939b
Piperaceae	<i>Piper sanjoseanum</i>	Carvajal 1939b
Picramniaceae	<i>Picramnia cuaternaria</i>	Carvajal 1939b
Plantaginaceae	<i>Plantago mayor</i>	Carvajal 1939b
Poaceae	<i>Oplismenus burmannii</i>	Pacheco 2012
Poaceae	<i>Oplismenus hirtellus</i>	Urtiaga 1986 por De la Iglesia y Cascaret 2000
Poaceae	<i>Paspalum paniculatum</i>	Sequeira 1958
Poaceae	<i>Pseudoechinolaena polystachya</i>	Sequeira 1958
Polygonaceae	<i>Polygonum acuminatum</i>	Sequeira 1958
Polygonaceae	<i>Polygonum capitatum</i>	Pacheco 2012
Polygonaceae	<i>Rumex crispus</i>	Sequeira 1958
Primulaceae	<i>Ardisia</i> spp.	Carvajal 1939b
Proteaceae	<i>Grevillea robusta</i>	Carvajal 1939b
Pteridophyta	<i>Adiantum macrophyllum</i>	Sequeira 1958
Pteridophyta	<i>Cyclosorus dentatus</i>	Sequeira 1958
Pteridophyta	<i>Thelypteris</i> sp.	Sequeira 1958
Rosaceae	<i>Prunus persica</i>	Carvajal 1939b
Rosaceae	<i>Rosa centifolia</i>	Carvajal 1939b
Roseaceae	<i>Eriobotrya japonica</i>	Maublanc y Rangel 1914, Carvajal 1939, Pacheco 2012
Rubiaceae	<i>Borreira laevis</i>	Urtiaga 1986 por De la Iglesia y Cascaret 2000
Rubiaceae	<i>Borreria exilis</i>	Pacheco 2012
Rubiaceae	<i>Borreria latifolia</i>	Pacheco 2012
Rubiaceae	<i>Borreria oximoides</i>	Carvajal 1939b
Rubiaceae	<i>Calycophyllum candidissimum</i>	Sequeira 1958
Rubiaceae	<i>Cinchona officinalis</i>	Sequeira 1958

Rubiaceae	<i>Cinchona</i> sp.	Plantwise Knowledge Bank 2015
Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Rubiaceae	<i>Coffea canephora</i>	Sequeira 1958
Rubiaceae	<i>Coffea liberica</i>	Sequeira 1958
Rubiaceae	<i>Coffea stenophylla</i>	Sequeira 1958
Rubiaceae	<i>Coutarea latiflora</i>	Pacheco 2012
Rubiaceae	<i>Diodia teres</i>	Sequeira 1958
Rubiaceae	<i>Hamelia patens</i>	Carvajal 1939b
Rubiaceae	<i>Microcarpus hirtus</i>	Carvajal 1939b
Rubiaceae	<i>Palicourea adusta</i>	Sequeira 1958
Rubiaceae	<i>Randia karstenii</i>	Carvajal 1939b
Rubiaceae	<i>Richardia scabra</i>	Carvajal 1939b
Rubiaceae	<i>Spermacoce ocymoides</i>	Sequeira 1958
Rubiaceae	<i>Spermacoce</i> sp.	Pacheco 2012
Rutacea	<i>Amyris elemifera</i>	Sequeira 1958
Rutacea	<i>Citrus sinensis</i>	Sequeira 1958, Uriaga 1986 citado por De la Iglesia y Cascaret 2000
Sapindaceae	<i>Paullinia cupana</i>	Sequeira 1958
Sapotaceae	<i>Calocarpum marmosum</i>	Carvajal 1939b
Sapotaceae	<i>Calocarpum sapota</i>	Arnold 1986 citado por De la Iglesia y Cascaret 2000
Scrophulariaceae	<i>Buddleia americana</i>	Carvajal 1939b
Simarubaceae	<i>Picramnia pentandr</i>	De la Iglesia y Cascaret 2000
Solanaceae	<i>Acnistus arborescens</i>	Carvajal 1939b
Solanaceae	<i>Browallia americana</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Solanaceae	<i>Browallia speciosa</i>	Sequeira 1958
Solanaceae	<i>Capsicum annum</i>	Carvajal 1939b
Solanaceae	<i>Capsicum frutescens</i>	Sequeira 1958
Solanaceae	<i>Cestrum reflexum</i>	Sequeira 1958
Solanaceae	<i>Cestrum</i> sp.	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Solanaceae	<i>Datura arborea</i>	Carvajal 1939b
Solanaceae	<i>Lycopersicum sculentum</i>	Carvajal 1939b
Solanaceae	<i>Solanum nigrum</i>	Carvajal 1939b
Solanaceae	<i>Solanum umbellatum</i>	Carvajal 1939b, Sequeira 1958
Urticaceae	<i>Pilea pubescens</i>	Pacheco 2012
Verbenaceae	<i>Aegiphila elata</i>	De la Iglesia y Cascaret 2000
Verbenaceae	<i>Clerodendrum lindenianum</i>	De la Iglesia y Cascaret 2000
Verbenaceae	<i>Lantana camara</i>	Sequeira 1958
Verbenaceae	<i>Verbena litoralis</i>	Carvajal 1939b
Violaceae	<i>Viola odorata</i>	Carvajal 1939b
Vitaceae	<i>Cissus sicyoides</i>	Sequeira 1958
Zingiberaceae	<i>Cistus hirsutus</i>	Sequeira 1958
Zingiberaceae	<i>Costus lima</i>	Sequeira 1958

Las familias con mayor cantidad de representantes son Rubiaceae (20), Asteraceae (14), Fabaceae y Solanaceae con 11 cada una.

Además, Carvajal (1939b) menciona a las familias Acanthaceae, Amaryllidaceae, Araceae, Iridaceae, Liliaceae y Onagraceae como hospederos de *M. citricolor*.

Otros hospederos mencionados son las orquídeas, los zacates y los helechos (Carvajal 1939b, Pacheco 2012).



No fue posible ubicar en ninguna familia al binomio *Alornia microcarpa* y al género *Suphea* spp. mencionados por Carvajal (1939b), posiblemente hay algún error de escritura en el documento original.

### **III. El patosistema**

Existen diferentes grados de susceptibilidad al ataque de ojo de gallo entre variedades de *C. arabica* y entre variedades derivadas del Híbrido de Timor y se han observado mayores ataques en Catimor que en las otras líneas del HdT. En general, las variedades Caturra, Catuaí y Villa Sarchí tienen mayor tolerancia a la enfermedad que los Catimores (Santacreo 2001, Avelino *et al.* 2007).

El mecanismo de patogenicidad de *M. citricolor* está relacionado a la toxina no específica denominada ácido oxálico, la cual es liberada por el hongo antes de la penetración. Esta provoca una disminución en el pH intracelular y secuestra el calcio de las paredes celulares del hospedero. A diferencia de otras relaciones hospedero patógeno en las que interviene esta toxina, no hay producción de pectina metil esterasa y los niveles de celulasas (Cx) y poligalacturonasas (PG) son muy bajos, por lo que la celulasa se degrada muy lentamente, provocando una lesión firme y sin maceración (Rao y Tewari 1987, Tewari 1990).

El patógeno produce otros metabolitos secundarios como D-manitol, ergosterol, peróxido de ergosterol y ácido citricólico, los cuales parece no están relacionados con el mecanismo de patogenicidad (Ayer y Browne, 1990). Además, produce la enzima oxidasa del ácido indolacético la cual es la responsable de los mayores efectos patogénicos del hongo (Rao y Tewari 1987, Sequeira y Steeves (1954).

Una vez que el hongo ingresa se forman cristales de oxalatos de calcio y de magnesio en la lesión necrótica. Por medio de estudios histoquímicos en estos tejidos se ha encontrado que hay dos veces más cantidad de oxalatos de calcio y tres veces más ácido oxálico en los tejidos con síntomas que en el tejido sano. También, se conoce que el hongo es capaz de secuestrar el ión magnesio y producir oxalatos de magnesio en las lesiones (Rao y Tewari 1987, Rao y Tewari 1989).

Welman (1972) indica que las hifas infectivas presentes en la gema se vuelven puntiagudas al entrar en contacto con la epidermis y penetran directamente. Otros autores como Tewari *et al.* (1986) mencionan que es necesaria la presencia de heridas previas a la inoculación del patógeno, aunque indican que no son resultados concluyentes, ya que en el campo se presentan lesiones en hojas sin daños mecánicos visibles.

Una vez formadas las lesiones se puede producir absición del follaje enfermo. Según Sequeira y Steeves (1954), este fenómeno se debe a la inactivación de reguladores de crecimiento más que a un daño mecánico por lesiones presentes en la vena central de las hojas, ya que el hongo evita el flujo normal de auxinas de la lámina hacia el peciolo.

#### **IV. La enfermedad y su epidemiología**

El ojo de gallo es conocida también como candelilla, viruela, ojo de pavo real, ojo de pollo, gotera del cafeto, mancha de hierro, maja, argeño, mancha de la hoja, mancha americana de la hoja del cafeto, orina de araña; eye spot of coffee, leaf spot of coffee, iron spot of coffee, american leaf spot of coffee, King coffea; petite vérole, champignon maculicole, maladie des feuilles noires du caféier, feuilles noires du caféier, maladie américaine du caféier, stilbose du caféier, amerikanische blattkrankheit y schwarzblättrigkeit (Alvarado 1937 citado por Uribe 1946, Farbenfabriken bayer aktiengesellschaft 1954, Rivillas-Osorio y Castro-Toro 2011, SENASICA 2014).

Es una de las enfermedades más importantes en Centro y Suramérica, así como en las Antillas. En Costa Rica y en Guatemala se le considera como uno de los principales problemas fitosanitarios del cafeto. La enfermedad se encuentra en todas las zonas cafetaleras de Costa Rica y se conoce desde 1880-1890. Para 1911 se habían publicado las primeras recomendaciones de manejo y los primeros reportes de daño fueron en 1938, período en el cual, cada catorce años, se presentaron ataques cíclicos de la enfermedad (1880-1894-1908-1922 y 1938). Es de gran importancia en las zonas medias y altas (1200 a 1600 msnm) donde se presentan lluvias frecuentes o permanecen bancos de niebla con regular periodicidad (Carvajal 1939a, Farbenfabriken bayer aktiengesellschaft 1954, Bonilla 1980, Borbón 1999, Robert 1999, Wang y Avelino 1999, Barquero 2007).

Si las condiciones climáticas son favorables (muy húmedas) y el manejo es inapropiado, la enfermedad es capaz de causar serias pérdidas económicas, debidas básicamente a la defoliación, aunque puede provocar caída de frutos. Para las condiciones de Guatemala, se estableció una correlación altamente significativa (76%) entre el índice de infección y el de defoliación en el mismo año, y se determinó que la infección presente incide sobre la caída de frutos de ese año (pérdidas primarias) y sobre la carga del año siguiente (pérdidas secundarias). Así, con una intensidad máxima de 50 % de incidencia se pueden alcanzar pérdidas primarias de 20% y secundarias de 49%. Sin embargo, pueden ascender hasta un 60% de la cosecha presente y hasta un 100% en el siguiente ciclo (Carvajal 1939a, Wellman 1950, Farbenfabriken bayer aktiengesellschaft 1954, Avelino *et al.* 1995, Wang y Avelino 1999, Barquero 2012).

La enfermedad puede atacar plantas en los semilleros y plantas adultas. Se caracteriza por la formación de pequeñas manchas en las hojas (0,5-1,0 cm de diámetro, aunque se menciona que pueden alcanzar los 2 cm), generalmente de forma circular. Sin embargo pueden ser ovaladas-alargadas si se ubican en las venas o tallos tiernos, e irregulares si algunas manchas coalescen. Cuando están jóvenes, son de color café oscuro y de color pardo claro cuando maduran, tornándose gris claro a medida que envejecen; son algo hundidas, con poca o ninguna clorosis alrededor.



**Figura 1.19.** Sintomatología del ojo de gallo. **A)** Defoliación, **B)** Lesiones, **C)** Estructuras pequeños (geminíferos) y estructura grande (basidiocarpio), **D)** Síntomas y signos en fruto.

Los bordes de la lesión son bien definidos, notándose por el haz y por el envés. Algunas veces, las lesiones jóvenes, expresan una coloración atípica, gris oscuro a negro y a veces rojiza, que se creyó debido a razas del patógeno, sin embargo hasta el momento no se conoce la razón de esta variación. Comúnmente se desarrollan desde 10 hasta 75 lesiones por hoja, aunque se conoce de un dato de 108 lesiones en una hoja grande y bien desarrollada. El número promedio de lesiones en las hojas antes de que se desprendan es de 20; sin embargo, si se presentan lesiones en la vena central, se produce caída prematura, aunque el número de lesiones en la lámina sea menor (Carvajal 1939, Wellman 1950, Wang 1988, Quesada 1996, Wang y Avelino 1999, Guerra 2004, Barquero 2007).

Usualmente, se considera que el ojo de gallo es una enfermedad importante en plantaciones viejas, mal manejadas y con exceso de sombrío. En realidad se puede presentar en cafetales sin sombra pero con pocas horas de sol y de cualquier edad que tengan siembras densas o en dirección contraria al viento, malezas altas y plantas con exceso de ejes verticales; ya que esas condiciones propician alta humedad relativa y luz difusa, que benefician el desarrollo de la enfermedad (Wellman 1950, CENICAFE s.f., Monterroso 1998, Vargas 2004, Avelino *et al.*, 2007).

El desarrollo de la epidemia depende de la fluctuación estacional de la lluvia y la humedad relativa, sobretodo de que la humedad se mantenga superior al 80%. Una vez que las lluvias empiezan, el número de hojas enfermas y el número de lesiones por hoja aumentan rápidamente. En Costa Rica, la máxima infección se presenta entre setiembre y octubre, que son los meses de mayor precipitación, empieza a reducir en diciembre y los niveles más bajos se dan entre febrero y mayo, que es la época más seca del año. No obstante, en algunas áreas, especialmente cerca de zonas boscosas, puede haber un fuerte rocío, que permite que la enfermedad continúe su desarrollo aún durante esta época (Wellman 1950, Bonilla 1980, PROMECAFE 1990, Ramírez 1994, Wang y Avelino 1999, Porras 2000, Guerra 2004, Vargas 2004, Barquero 2007).

La dispersión de la enfermedad es, principalmente a través de pequeñas gotas de lluvia, con un máximo de 56.4 cm de la fuente, expandiéndose horizontalmente unos 183 m por año. Los sitios más vulnerables de las fincas son hondonadas donde se deposita el agua, orillas de cerca colindantes con plantaciones descuidadas, proximidad de la selva, bajos de subsuelo

arcilloso, proximidad a ciénegas y cursos de agua, laderas deslavadas y en general terrenos de poca fertilidad (Carvajal 1939, Wellman 1950, Molina 1952).

Otras formas de diseminación son tejidos infectados, viento húmedo, almácigo enfermo, pájaros, murciélagos, insectos especialmente nocturnos y el hombre. Aparece por primera vez en cultivos nuevos luego de 4 años de establecido y en distintas áreas de la plantación (Carvajal 1939a). Aunque se menciona al viento húmedo como agente de dispersión, debido al tamaño de los geminíferos parece poco probable. Además, la forma de ingreso inicial a las plantaciones no está todavía explicada.

Con respecto a su velocidad de desarrollo, se sabe que es de tipo policíclica pero de desarrollo relativamente lento, debido a que presenta una tasa de infección aparente ( $r$ ) baja. Los únicos valores reportados en la literatura son de 0.02 y 0.015. Aunque, se considera de ciclo múltiple, se ha demostrado que el nivel de inóculo primario es importante en el desarrollo de la epidemia, ya que mientras más alto es, más rápidamente se alcanza la máxima infección (Arauz 1998, Wang y Arauz 1999, Wang y Avelino 1999).

Se presume que para el ojo de gallo, al igual que para la roya anaranjada, la mayor fuente de inóculo inicial es el inóculo presente en las lesiones producidas el año anterior, denominado inóculo residual (IR). Se indica que la enfermedad se mantiene en estado latente en lesiones viejas durante la época seca y activa su desarrollo cuando entran las primeras lluvias (Carvajal 1939, Ramírez 1994, Avelino *et al.* 1999).

Existe una correlación positiva entre el inóculo residual, medido como porcentaje o número de hojas viejas con lesiones (hojas nacidas en el año "n-1") observadas en el año "n" y el porcentaje de lesiones capaces de producir cabecitas al inicio de la estación lluviosa del año "n"; así, se observa un adelanto en el desarrollo de la epidemia en los cafetales que presentan mayor cantidad de inóculo residual (Avelino *et al.* 1995, Wang y Avelino 1999).

## **V. El manejo de la enfermedad**

El uso apropiado de las variedades se puede considerar dentro de una estrategia de manejo integrado, así Santacreo (2001), indica que en localidades con alturas entre los 800-1400 msnm, donde la roya no sea problema y el ojo de gallo o la mancha de hierro (*Cercospora*

*coffeicola*) puedan causar daños económicos, la siembra de la variedades Catuaí, Caturra y Villa Sarchí es una buena alternativa, mientras que, en zonas donde la roya es de importancia económica, se recomiendan las variedades de Catimor.

Antes de la década de 1950, las estrategias usadas fueron netamente culturales, entre ellas la poda y defoliación de plantas muy afectadas, la poda por hileras, la deshija adecuada, el combate de malezas, la reducción de sombra, así como la mejora del sistema de drenaje, de la fertilización y el distanciamiento entre plantas y surcos (Echandi y Segall 1958, Mora 1999, Barquero 2007).

Desde 1939 Carvajal mencionaba la importancia de la poda y la deshija “racional” para mejorar la aireación en la plantación e indicaba el efecto de la posición (inclinación o protección por colinas) sobre el mantenimiento de aire húmedo en el cultivo lo que permitía el establecimiento de la enfermedad. En este sentido Avelino *et al.* (1992) indicaron que la recepa<sup>4</sup> por surco aumenta la circulación de aire y reduce la incidencia de la enfermedad en los surcos que quedan expuestos al sol. Siendo que es más efectiva en los surcos con orientación de este a oeste por permitir mayor penetración del sol (Wang y Avelino 1999).

Con respecto a la sombra se conoce que modifica el microclima e incrementa los nichos ecológicos en los cafetales lo que favorece el establecimiento y desarrollo del ojo de gallo, al disminuir la velocidad del viento, promover mayor humedad relativa del aire y por el hecho de que algunas especies de sombra son huéspedes alternos del patógeno; aunque se apunta que un efecto beneficioso de la sombra es la disminución de la dispersión de los propágulos (Rapidel *et al.* 2015); sin embargo, aparentemente cuando existe sombra de árboles maderables las gotas de lluvia caen con mayor energía cinética que facilita la dispersión de los geminíferos lo que aumenta la enfermedad<sup>5</sup>. Siendo así, se debe tener mucho cuidado con el manejo de la sombra como herramienta para el combate de *M. citricolor*, porque como indican Liebig *et al.* (2015) la intensidad de la enfermedad está influenciada por la interacción

---

<sup>4</sup> Poda drástica que consiste en eliminar la parte aérea a una altura de 30 ó 40 cm del suelo, se recomienda en plantas deterioradas con poca producción.

<sup>5</sup> Avelino, J. 2015. Efecto de la sombra de árboles maderables sobre el ojo de gallo. CATIE/CIRAD /PROMECAFE. Comunicación personal.

entre la sombra y los factores ambientales de acuerdo al sitio específico, a lo que se podría añadir la especie del árbol utilizado.

El manejo en Costa Rica se basa fundamentalmente en el combate químico. Este se hace calendarizadamente y no se realiza una cuantificación para tomar la decisión de aplicar, por lo que no siempre es efectivo, especialmente cuando prevalecen condiciones de extrema humedad (Monterroso 1998, Mora 1999, Avelino *et al.* 2007).

Cuando se afianzó el combate químico, uno de los primeros productos usados para ojo de gallo fue el caldo bordelés, pero era poco efectivo y de alto costo económico, por lo que se inició con la evaluación de varias fuentes de cobre, encontrando buen efecto. De esta forma desde hace más de 60 años se utilizan como parte del combate químico. Debido a que es difícil mantener una capa adecuada de producto sobre el follaje en las zonas con mayores problemas, ya que se presentan condiciones de alta precipitación, se disminuye la efectividad. Por ello se propuso cambiar de productos protectores a erradicantes y fue cuando se introdujeron los productos a base de mercurio y arseniato (de plomo y de calcio) que resultaron muy efectivos (Carvajal 1939, Pérez 1952 citado por Echandi y Segall 1958, Echandi y Segall 1958).

Para el año 1960 se establecieron las dosis y épocas de aplicación para el arseniato de plomo que resultó ser el mejor producto y no presentaba fitotoxicidad ni problemas de acumulación en grano si se utilizaba de la manera recomendada. Sin embargo, debido la utilización inadecuada del producto se prohibió su importación y uso en el año 1990 (Bianchini 1960, Mora 1999).

A partir de la prohibición de uso del arseniato se inició con la evaluación de otros productos, dando como resultado el uso mayoritariamente de triazoles para el combate de la enfermedad. Para el año 1999 se encontraban registrados por el Servicio Fitosanitario del Estado productos protectores a base de caldo bordelés, óxido de cobre en mezcla con Mn y Zn, hidróxido de cobre, sulfato de cobre, mancozeb en mezcla con óxido cuproso, mancozeb en mezcla con sulfato de cobre, oleato cúprico, oxiclорuro de cobre; y sistémicos como tebuconazol en mezcla con triadimenol, cyproconazol, azoxistrobina, epoxiconazol y TCMTB. Actualmente

los productos registrados son clorotalonil, oxiclورو de cobre, hexaconazol, epoxiconazol en mezcla con pyraclostrobin, oxido cuproso y tebuconazol en mezcla con triadimenol para el manejo químico de la enfermedad en Costa Rica (Mora 1999, Insumosys 2015).

La mayoría de investigaciones de evaluación de productos han sido realizadas por el ICAFE. En este sentido, el CICAPE (2011) registra 20 experimentos bajo el tema de ojo de gallo, de los cuales el 70% correspondió a combate químico, principalmente al efecto de “antiesporulantes”<sup>6</sup> y un 10% a combate biológico, todas ellas enfocadas al control del inóculo secundario.

Se han realizado otros esfuerzos para lograr un manejo adecuado de la enfermedad, por ejemplo investigaciones referentes a combate biológico, en las que se han evaluado tanto hongos como bacterias antagonistas. Se reporta el efecto *in vitro* y en campo de aislamientos de *Trichoderma* sp. y *T. harzianum*, para los que se ha determinado su capacidad de establecerse dentro del tejido necrótico de la lesión y su acción parasítica sobre micelio y geminíferos. También, se conoce que es posible combinarlo con aplicaciones de cobre (Arroyo 1975, Vargas 1984, Porras 2000, Ojeda y Suèscum 2012).

Otros antagonistas promisorios son *Xylaria feejeensis*, *Pleospora* spp., *Schizophyllum commune* y *Pycnoporus sanguineus*, el cual produjo inhibición del crecimiento del micelio, parasitismo y destrucción de hifas (Ojeda y Suèscum 2012).

Con respecto a bacterias antagonistas, se ha informado de acción fungistática a nivel de laboratorio y campo de bacterias recuperadas del filoplano del cafeto. Empero, con resultados positivos en condiciones de baja presión de inóculo y al inicio del período lluvioso (Mora 1987, Calvo 1989, Quesada 1996).

En otras investigaciones, se ha evaluado la importancia de la nutrición, la cantidad de luz, el uso de coberturas foliares (extracto de hojas de guarumo, antitranspirante a base de carnauba, adherente de polietileno), así como aplicaciones de yodo y calcio (Solórzano 1987, Rao y Tewari 1988, Jiménez 1992, Ramírez 1994); sin embargo, prácticamente todas fueron pruebas preliminares a nivel de laboratorio, excepto las realizadas por Vargas *et al.* (1990),

---

<sup>6</sup> Se debe tener cuidado con el uso de este término relacionado a la fase asexual de *M. citricolor*, ya que este hongo no produce fase conidial.



Avelino *et al.* (1992) y Mora (1997), estos investigadores probaron el efecto de alcalinizar el cultivo como estrategia para provocar condiciones desfavorables al patógeno.

Avelino *et al.* (1992) aplicaron 3 veces caldo bordelés alcalino (sulfato de cobre en mezcla con hidróxido de calcio) y reportaron que esta mezcla incrementa la residualidad de los productos y ejerce un buen control sobre la enfermedad.

En el mismo sentido, Mora (1997) concluye que si se realizan aplicaciones foliares con mezclas de fungicidas (triazoles + cobres) más un agente alcalinizante, como hidróxido de magnesio ó metalosato de magnesio y calcio, llevando la mezcla a un pH de 8, se logra reducir la enfermedad entre 60 y 70% en comparación a la aplicación de solo fungicidas, además se logra disminuir el inóculo secundario, ya que mejora la solubilidad de los cobres, maximiza el efecto fungicida y se logra una disminución de la captura del calcio de las paredes debido a la participación de los iones Mg y Ca en la mezcla.

En los últimos años se han evaluado opciones alternativas como los extractos de plantas y los lixiviados y tés de vermicompost. En el primer caso se encontró que *Ipomoea nil* y *Brugmansia suaveolens* presentan efectos inhibitorios en la producción de inóculo secundario. Por otro lado, se determinó que el té de vermicompost de estiércol bovino presenta un efecto en la disminución de la enfermedad; mientras que, el té de vermicompost caprino favoreció el desarrollo del hongo (Orozco 2000, Zamora 2012).

Cualquiera que sea la táctica a utilizar debe incorporarse a una estrategia integrada de manejo sostenible y de acuerdo a Wang y Arauz (1999) deben ir enfocada en reducir el inóculo primario y disminuir la tasa de infección (mediante la reducción de la tasa de producción del inóculo secundario, disminución de la dispersión de gemas y reducción de la proporción de gemas capaces de infectar tejido sano) para retardar sustancialmente la epidemia de ojo de gallo.

## Literatura citada

- Achicanoy, H. 2000. Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. Vol.53 (1): 941-968.
- Agrios G. 2005. Plant Pathology. 5ed. Elsevier Academic Press. 948p
- Alvarado J.A. 1937. Enfermedades del cafeto. El café de El Salvador. 7: 28-40. *Fuente original*: Uribe, H. 1946. La gotera el café. Monografía. Curso Fitopatología. Facultad Nacional de Agronomía. Medellín, Colombia. 249-260.
- Albertin A, Nair PKR. 2004. Farmers' Perspectives on the Role of Shade Trees in Coffee Production Systems: An Assessment from the Nicoya Peninsula, Costa Rica. Human Ecology Vol. 32 (4): 443-463.
- Anthony F, Astorga F, Berthaud J. 1999. Los recursos genéticos: las bases de una solución genética a los problemas de la caficultura latinoamericana. In Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. San José, Costa Rica. IICA. p. 369-405.
- Anzueto F. 2013. Variedades de café resistentes a la roya. Asociación Nacional de Café (ANACAFE). Consultado 02 jun. 2015. Disponible en [http://www.anacafe.org/glifos/index.php/Variedades\\_resistentes\\_a\\_roya](http://www.anacafe.org/glifos/index.php/Variedades_resistentes_a_roya)
- Arauz LF. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. p. 265-280.
- Araya M. 1994. Distribución y niveles poblacionales de *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. en ocho cantones productores de café en Costa Rica. Agronomía Costarricense 18:183-187.
- Arcila-Pulgarín J, Buhr L, Bleiholder H, Hack H, Wicke H. 2001. Aplicación de la “Escala BBCH ampliada” para la descripción de las fases fenológicas del desarrollo de la planta de café (*Coffea* sp.). Chinchiná, Caldas, Colombia. CENICAFE.32p.
- \_\_\_\_\_. 2007. Crecimiento y desarrollo de la planta de café. In Arcila-Pulgarín,J; Farfán, F; Moreno, M; Salazar, F; Hincapié, E. Sistemas de producción de café en Colombia. Chinchiná, Colombia. CENICAFE.309 p.
- Arnold G.R.W. 1986. Lista de hongos fitopatógenos de Cuba. Ed. Científico-Técnica. La Habana. p41. *Fuente original*: De la Iglesia D, Cascaret L.2000. Especies hospedantes de *Mycena citricolor* (Berk., et Curt.) Sacc. en plantaciones de cafeto (*Coffea arabica* L.). Fitosanidad. Vol. 4 (1-2):21-22.
- Arroyo, T. 1975. Control biológico del ojo de gallo en el café causado por *Mycena citricolor* (Berk & Curt) Sacc. en época seca. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 65p.

- Avelino, J. Toledo, J. Medina, B. 1992. El caldo bordelés y la recepa en el control del ojo de gallo. In ANACAFE-DICAFE. Memoria técnica de investigaciones en café 1990-1991. p. 123-129.
- \_\_\_\_\_. Toledo, J. Medina, B. 1995. Desarrollo del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en una finca del norte de Guatemala y evaluación de los daños provocados por esta enfermedad. XVI Simposio de Caficultura Latinoamericana. Managua, Nicaragua. 25-29 de octubre 1993.
- \_\_\_\_\_. Muller, R. Eskes, A. Santacreo, R. Holguín, F. 1999. La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. In Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. IICA, San José, Costa Rica. p. 193-242.
- \_\_\_\_\_. Cabut, S. Barboza, B; Barquero, M; Alfaro, R; Esquivel, C; Durand, JF; Cilas, C. 2007. Topography and crop management are key factors for the development of american leaf spot epidemics on coffee in Costa Rica. *Phytopathology* 97: 1532-1542.
- Ayer, WA; Browne, LM. 1990. Investigaciones químicas de metabolitos tóxicos de *Mycena citricolor*, el agente causal del ojo de gallo del cafeto. In Taller regional sobre roya, ojo de gallo y otras enfermedades del cafeto. San José, Costa Rica. 17-20 jul. *Sólo resumen*.
- Baldrian P. 2010. Effect of heavy metals on saprotrophic soil fungi. In: Soil Heavy Metals, Soil Biology, Vol19. Sherameti I. y Varma A. eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 263-279.
- Barquero, M. 2007. Algunas consideraciones sobre el ojo de gallo. Revista Informativa del Icafé. I-2007: 11-15.
- Barquero, M. 2010a. Más de 75.000 fanegas de café se perdieron por ‘ojo de gallo’ (en línea). La Nación. Consultado 13 may. 2011. Disponible en <http://www.nacion.com/2010-10-23/Economia/NotasSecundarias/Economia2564575.aspx>
- Barquero, M. 2010b. Cafetaleros perdieron 12% de cosecha por lluvia y plagas. (en línea). La Nación. Consultado 13 may. 2011. Disponible en <http://www.nacion.com/2010-12-17/Economia/NotaPrincipal/Economia2624844.aspx>
- Barquero M. 2012. Sistema de alerta temprana para el ojo de gallo. Revista Informativa Icafe. No. 2 Año 6. p.2-4.
- Beer, J. 1988. Litter production and nutrient cycling in coffee (*Coffea arabica*) or cacao (*Theobroma cacao*) plantations whit shade trees. *Agroforestry Systems* 38:139–164.
- \_\_\_\_\_; Muschler, R; Kass, D; Somarriba, E. 1998. Shade management in coffee and cacao plantations. *Agroforestry Systems* 38: 139-164.
- Bermudes D, Gerlach V, Nealson K.1990. Effects of culture conditions on mycelial growth and luminescence in *Panellus stypticus*. *Mycologia* 82(3): 295-305.

- Bertrand, B; Aguilar, G; Santacreo, R; Anzueto, F.1999. El Mejoramiento Genético en América Central. *In* Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. San José, Costa Rica. IICA. p. 407-456.
- Bianchini C. 1960. Informe resumido sobre la “mancha mantecosa”, “chasparria” y “ojo de gallo” del café en Costa Rica. Servicios técnicos de café y cacao. Vol. 2(5): 31-34.
- Bonilla, GJ. 1980. Estudio del ojo de gallo causado por el hongo *Mycena citricolor*. III Simposio Latinoamericano sobre caficultura, Honduras, IICA. p. 177-188.
- Borbón O. 1999. Consideraciones sobre la problemática del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en Costa Rica 1999. *In* “Memoria” XI Congreso Agronómico /IV Congreso Nacional de Fitopatología. p. 21-25.
- Buller R, Vanterpool T. 1926. The bioluminescence of *Omphalia flavida*, a leaf spot fungus. *Phytopathology* 26:63
- \_\_\_\_\_. 1958. *Omphalia flavida*, a gemmiferous and luminous leaf-spot fungus. *In* Researches on fungi. London. London, New York. Vol.6: 397-442.
- CAB International. 1975. Mapa de distribución mundial del hongo *Mycena citricolor*. 4ed. Distribution maps of plant disease
- CAB International. 1996. Mapa de distribución mundial del hongo *Mycena citricolor*. 5ed. Distribution maps of plant disease.
- Chaves, G; Cerdas, V; López, K; Tristán, A; Vargas, LC. 2010. Estadísticas de comercio exterior de Costa Rica, 2009. San José, CR. PROCOMER
- Calvo, S. 1989. Combate biológico de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) del cafeto mediante bacterias antagonistas en el campo. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 47p.
- Camargo, A; M, Camargo. 2001. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. *Bragantia*, Campinas, 60(1), 65-68.
- Campbell, C; Madden, L. 1990. Introduction of plant disease epidemiology. Wiley-Interscience Publication. p. 190-191.
- Cannon PF, Kirk PM. 2007. Fungal families of the world. CABI. 456 p.
- Carvajal F. 1939a. Ojo de gallo (*Omphalia flavida*). Revista del Instituto de Defensa del Café de Costa Rica. Tomo 7. No.52. p. 535-549.
- Carvajal F. 1939b. Ojo de gallo (*Omphalia flavida*): Segunda parte, la forma perfecta del hongo “*Omphalia flavida*” creciendo libremente en la naturaleza como parásito sobre plantas vivas, en el distrito cafetalero del Zapote (Prov. de San José, CR). Revista del Instituto de Defensa del Café de Costa Rica. Tomo 7. No.52. p. 550-565.

- CENICAFE. s.f. Enfermedades y disturbios del café (en línea). Consultado 24 abr. 2011. Disponible en [http://www.cenicafe.org/modules.php?name=Enfermedades\\_y\\_Disturbios\\_del\\_Cafe&file=informacion&Id=13&NI=0](http://www.cenicafe.org/modules.php?name=Enfermedades_y_Disturbios_del_Cafe&file=informacion&Id=13&NI=0)
- CICAFE, 2011. Informe de investigaciones concluidas 2006 -2010. Icafe, Costa Rica. 58p
- Cole G. 1987. Preparation of microfungi for scanning electron microscopy. *In* Ultrastructure techniques for microorganisms. Aldrich H C, Todd W (eds.) Plenum Press, NY. 11-14pp.
- Comisión de Agricultura de las Indias Occidentales. 1914. A parasite on coffee. Montly bulletin of Agricultural Intelligence and Plant Diseases. Imperial department of agriculture for the West Indies. Vol XIII.
- DaMatta, F; Rodríguez, N. 2007. Producción sostenible de cafetales en sistemas agroforestales del Neotrópico: una visión agronómica y ecofisiológica. *Agronomía Colombiana* Vol.25 (1): 113-123.
- De la Iglesia D, Cascaret L. 2000. Especies hospedantes de *Mycena citricolor* (Berk., et Curt.) Sacc. en plantaciones de cafeto (*Coffea arabica* L.). *Fitosanidad*. Vol. 4 (1-2):21-22.
- Dennis R.W.G. 1950. An Earlier Name for *Omphalia flavida* Maubl. and Rangel. *Kew Bulletin*, Vol. 5(3):434.
- \_\_\_\_\_. 1961. Fungi venezuelani: IV. Agaricales. *Kew Bulletin* Vol. 15 (1): 67-156
- Desjardin D.E, Capelari M, Stevani C. 2007. Bioluminescent *Mycena* Species from São Paulo, Brazil. *Mycologia* Vol 99 (2): 317-331.
- Desjardin D.E, Oliveira A. Stevani S. 2008. Fungi bioluminescence revisited. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7: 170–182
- Dighton J, Tugay T, Zhdanova N. 2008. Interactions of Fungi and Radionuclides in Soil. *In* Dion P y Nautiyal C.S. eds., *Microbiology of Extreme Soils*. Soil Biology 13. SpringerVerlag-BerlinHeidelberg.pp.333-355.
- Echandi R, Echandi E. 1958. Influencia de vitaminas y aminoácidos en el crecimiento y esporulación de *Mycena citricolor*, *Phoma costarricensis*, *Cercospora coffeicola* y *Ceratostomella fimbriata*. *Rev. Biol.Trop.* 6(1):103-11.
- Echandi E, Segall R.H. 1958 The effectiveness of certain eradicant fungicides on inhibition of gemma of *Mycena citricolor*. *Phytopathology* Vol. 48:11-14.
- Organización Internacional del Café (ICO). 2015. Total production by all exporting countries. In thousand 60kg bags. Consultado 20 oct. 2015. Disponible en <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>

- Farbenfabriken bayer aktiengesellschaft.1954.Bayer Pflanzenschutz Compendium II: colour plates and biological data. Leverkusen, Bayer. p. 427
- Fournier, LA. 1988. El cultivo del cafeto (*Coffea arabica* L.) al sol o a la sombra: un enfoque agronómico y ecofisiológico. *Agronomía Costarricense* 12(1): 131-146.
- García J. 2012. Caracterización biológica del hongo *Mycena citricolor* Berk & Curt, con aislamientos obtenidos de cultivares de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de las diferentes zonas cafetaleras de Guatemala, C.A. Tesis Lic. Universidad de San Carlos de Guatemala. 51p.
- García, E.A. 2015. Variedades de café. Asociación Nacional de Café (ANACAFE). Consultado 02 jun. 2015. Disponible en [http://www.anacafe.org/glifos/index.php/Variedades\\_de\\_café](http://www.anacafe.org/glifos/index.php/Variedades_de_café)
- Guerra, B. 2004. Experiencias del manejo de las enfermedades fungosas presentes en el cultivo de café (*Coffea arabica*) en finca de pequeños caficultores en la aldea La Montaña, Moyuta, Jutiapa. Tesis Lic. San Carlos, Guatemala. 55p.
- Gupta R. 2004. The textbook of fungi. S.B. Nangia. New Dehli. India. 350p.
- Hernández, T. 2005. Fundamentos de análisis y manejo sistémico de epidemias de cultivos tropicales. INCADES. Perú. 71p.
- Hernández, I. 2009. Diversidad de macrohongos de hojarasca en el bosque estatal de Guajataca. Tesis M.Sc. Universidad del Turubao, Puerto Rico. 93p.
- Hibbett D, Thorn R. 2001. Basidiomicotina: holobasidiomicetes. In: The mycota VII Part B. Systematics and evolution. McLaughlin, McLaughlin, Lemke. eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 121-168.
- ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). 2011. Caficultores se preparan ante el cambio climático. Consultado 17 may. 2011. Disponible en [http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe\\_cambio\\_climatico/CLIMA%20CAFE%20-%20110211.pdf](http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe_cambio_climatico/CLIMA%20CAFE%20-%20110211.pdf)
- \_\_\_\_\_. 2011. Guía técnica para el cultivo del café. ICAFE-CICAFE. 72 p.
- \_\_\_\_\_. 2012. Café de Costa Rica. Material audiovisual preparado por el ICAFE para la Conferencia Internacional en Ciencias del Café, ASIC Costa Rica.11 al 16 de nov.
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos, CR).2015. VI Censo Nacional Agropecuario 2014. Resultados generales. INEC-MAG. 42p.
- Index Fungorum. 2015. *Mycena citricolor*. (en línea). Consultado 06 jun.2015. Disponible en <http://www.indexfungorum.org>
- Insumosys. 2015. Productos registrados bajo la búsqueda café+*Mycena citricolor*. Centro de consulta de insumos. Servicio Fitosanitario del Estado. Costa Rica. (en línea). Consultado 09 jul. 2015. Disponible en <http://www.sfe.go.cr/insumosys>

- Jiménez, R. 1992. Estrategias de combate de ojo de gallo (*Mycena citricolor*)(Berk. & Curt) Sacc. con una fuente de calcio y ciproconazole (San 619 F) en el cafeto. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 40 p.
- Jiménez, A. 2013. El café en Costa Rica: gran modelador del costarricense. San José, Costa Rica. Editorial UCR. 692 p.
- Kushalappa, A; Ludwig, A. 1982. Calculation of apparent rate in plant disease: development of method to correct for host growth. *Phytopathology* 72: 1373-1377.
- Lentz P.L., Lipscomb B.R., Farr D.F. 1975. Fungi and diseases of *Erythroxylum*. *Phytologia*. Vol. 30(1):350-368.
- Liebig T., Läderach P., Quiroga A., Anzueto F., N Matute., Avelino J. 2015. Spatial Decision Support for Coffee Disease Management–Site-Specific Shade–Environment Interaction affecting American Leaf Spot Disease. The 25th international conference on coffee and science, Armenia, Colombia.
- Linnaeus, CV. 1753. *Coffea arabica*. In *Species plantarum: exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*. *Species Plantarum*. Vol 1(172).
- López A. 2001. Caracterización molecular y morfológica de aislamientos del hongo *Mycena citricolor* colectados en diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica. Tesis M.Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 91p.
- Luttrell E. S. 1974. Parasitism of Fungi on Vascular Plants. *Mycologia*, Vol. 66 (1): 1-15.
- Maublanc M.M, E Rangel. 1914. Le *Stilbum flavidum* Cooke, forme avortée de l'*Omphalia flavida* n. sp. Bulletin Trimestral de la Société Mycologique de France. pp. 41-47.
- Molina, J. 1955. *Omphalia flavida*. Monografía para el curso de Fitopatología. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica. 13p.
- Moncalvo J.M, Vilgalys R, Redhead S, Johnson J. E, James T, Aime M.C, Hofstetter V, Verduin S, Larsson E, Baroni T.J, Thorn G, Jacobsson S, Clemencon H, Miller O.K. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 357–400.
- Montenegro, J. 2011. Cambio climático y la actividad cafetalera en Costa Rica. Presentación Power Point. Consultado 17 may. 2011. Disponible en [http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe\\_cambio\\_climatico/ICAFE-Marzo10-2011-F.pdf](http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe_cambio_climatico/ICAFE-Marzo10-2011-F.pdf)
- Monterroso, D. 1998. Posibilidades de manejo integrado de la enfermedad "Ojo de gallo" del café. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 47: I-IV. *Sólo resumen*.

- Mora, F. 1987. Combate biológico de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) Berk. & Curt Sacc en café mediante bacterias antagonistas. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 58p.
- Mora, O. 1997. Estudio del efecto del pH alcalino en la atomización para el control del ojo de gallo (*Mycena citricolor*). In XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura. IICA-PROMECAFE. EDITORAMA. p.393-399.
- Mora J. 1999. El papel del MAG en el combate del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el cultivo del café. In: "Memoria" XI Congreso Agronómico /IV Congreso Nacional de Fitopatología. p.17-19.
- Morais, H; Koguish, M.S; Caramori, P.H; Ribeiro, A.M. 2005. Avaliação do desenvolvimento reprodutivo de cafeeiros sombreados em diferentes épocas. In IV Simpósio de pesquisa dos Cafés do Brasil, Londrina.
- Muschler, R. 1997. Árboles en cafetales. Material de enseñanza No. 45. Colección de módulos de enseñanza agroforestal. Módulo 5. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 139 p.
- \_\_\_\_\_. 2001. Shade improves coffee quality in a sub-optimal coffee-zone of Costa Rica. Agroforestry systems. 85:131–139.
- Mycobank. 2015. *Mycena citricolor*. (en línea). Consultado 06 jun.2015. Disponible en <http://www.mycobank.org>
- Nutter, FW. 2007. The rol of plant disease epidemiology in developing successful integrated disease management programs. In: Ciancio, A; Mukerji, KG. eds. General concepts in integrated pest and disease management. Springer. p. 45-79.
- Ojeda K, Suèscom J. 2012. Evaluación de cinco cepas de hongos nativos como controladores biológicos de la enfermedad "Ojo de Pollo" (*Mycena citricolor*) en café (*Coffea arabica*) en condiciones in vitro. Tesis Bach. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador. 68p.
- Okada G, Takematsu A, Gandjar I, Nakase T. 1998. Morphology and molecular phylogeny of *Tretopileus sphaerophorus*, a synnematus hyphomycete with basidiomycetous affinities. Mycoscience 39:21-30
- Orozco X. 2000. Evaluación preliminar de extractos vegetales para el combate de ojo de gallo *Mycena citricolor* Bert & Curt Sacc. en café *Coffea arabica* bajo condiciones in vivo. (en línea). Consultado 09 jul. 2015. Disponible en [http://www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/ojogallocafe.pdf](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/ojogallocafe.pdf)
- Pacheco A. 2012. Epidemiología de la enfermedad ojo de gallo del café (*Coffea arabica*) causada por el hongo *Mycena citricolor* Berk & Curt en el área centro occidental de Guatemala, C.A. Tesis Lic. Universidad de San Carlos de Guatemala. 81p.
- Pegler D.N. 1987. A Revision of the Agaricales of Cuba 1. Species Described by Berkeley & Curtis Kew Bulletin Vol 42(3): 501-585.



- Pérez V.M. 1952. Control del “ojo de gallo” por medio de fungicidas. Suelo Tico 6:264-271. Fuente original: Echandi E, Segall R.H. 1958 The effectiveness of certain eradicant fungicides on inhibition of gemma of *Mycena citricolor*. Phytopathology Vol. 48:11-14.
- Perfecto, I; Rice, R; Greenberg, R; Van der Voort, M. 1996. Shade coffee: a disappearing refuge for biodiversity. BioScience, Vol. 46 (8): 598-608.
- Perfecto, I; Armbrecht, I; Philpott, S; Soto-Pinto, L; Dietsch, T. 2007. Shaded coffee and the stability of rainforest margins in northern Latin America. In Tschardt T, Leuschner C, Zeller M, Guhardja E, Bidin A (eds). The stability of tropical rainforest margins, linking ecological, economic and social constraints of land use and conservation, Springer Verlag Berlin. p. 227-263.
- Pezzopane, J; Júnior, P; Thomaziello, R; Camargo, M .2003. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro arábica. Bragantia, Campinas, v.62, n.3, p.499-505.
- Plantwise Knowledge Bank. 2015. Distribution map of American leaf spot of coffee (*Mycena citricolor*) (en línea). Consultado: 02 jun. 2015. Disponible en <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap.aspx?speciesID=28017&dsID=35243&loc=global>
- Porras, A. 2000. Evaluación de la actividad in vitro del género *Hypocrea* contra 2 hongos fitopatógenos de importancia agrícola (*Fusarium* sp. y *Mycena citricolor*). Tesis Bach. Cartago, CR. ITCR. 97p.
- PROMECAFE (Programa Cooperativo para la protección y modernización de la caficultura en México, Centroamérica y Panamá). 1990. VIII Curso regional sobre fundamentos de la caficultura moderna. Turrialba, CR. CATIE. p. 6-7.
- PROCOMER (Promotora Comercio Exterior).2015. Estadísticas de comercio exterior de Costa Rica 2014. PROCOMER.239p.
- Puttemans A. 1904. Sur la maladie du Caféier produite par le *Stilbella flavida*. Bulletin Trimestral de la Société Mycologique de France. 20 (1):157-164.
- Quesada, D. 1996. Efecto del adherente y época de aplicación de una bacteria antagonista en el combate de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) Berk. & Curt Sacc. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 41p.
- Ramírez, C. 1994. Estudio preliminar sobre el efecto del manejo nutricional y de la luz en el contenido de cera cuticular y el uso de coberturas foliares en la infección de *Mycena citricolor* (Berk. y Curt) Sacc. en hojas de cafeto. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 70p.
- Rao, DV; Tewari, JP. 1987. Production of oxalic acid by *Mycena citricolor*, causal agent American leaf spot of coffee. Phytopathology 77:789-785.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1988. Suppression of the symptoms of American leaf spot of coffee with calcium hydroxide. Plant disease 72 (8): 688-690.

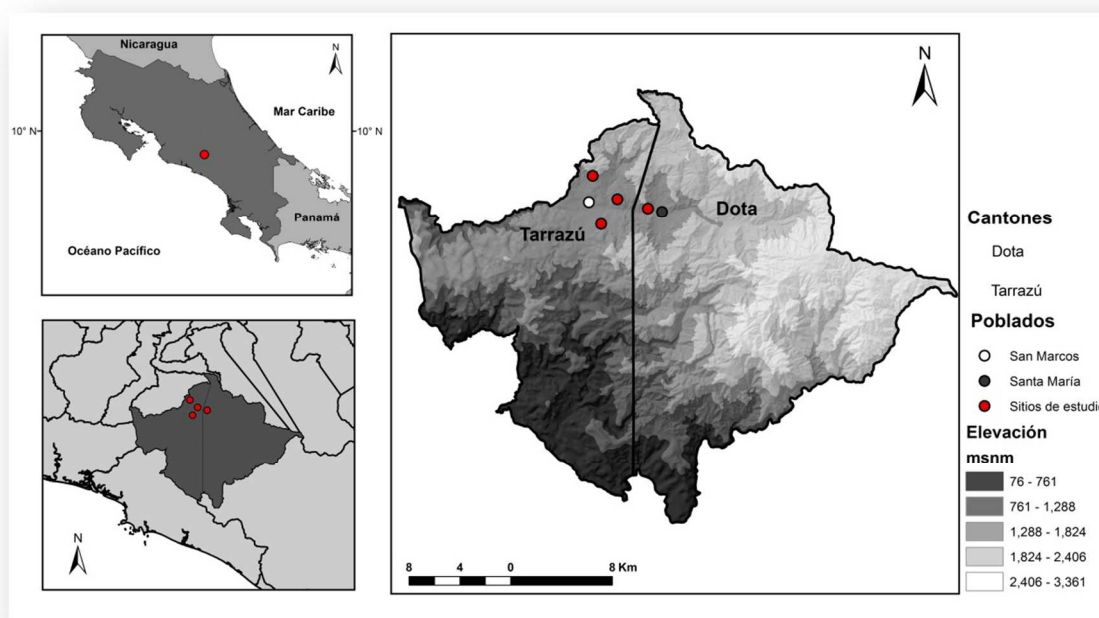
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1989. Ocurrence de magnesium oxalate crystals on lesion incited by *Mycena citricolor* on coffee. *Phytopathology* 79:783-787.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Vargas, E. 1986. Estudio preliminar sobre el modo de penetración de *Mycena citricolor* en la hoja de cafeto. *Agronomía Costarricense*. 10:199-202.
- Rapidel B., Allinne C., Cerdán C., Meylan L., Virginio E., Avelino J. 2015. Efectos ecológicos y productivos del asocio de árboles de sombra con café en sistemas agroforestales. In Montagnini F, Somarriba E, Murgueitio E, Fassola H y Eibl B. eds. *Sistemas agroforestales funciones productivas, socioeconómicas y ambientales*. Informe técnico No. 402 p.5-20.
- Rayner A.D.M, Watling R, Frankland J.C. 1985. Resource relation: an overview. In *Developmental Biology of Higher Fungi*. British Mycological Society. D. Moore, L.A. Casselton, D.A. Wood, J.C. Frankland eds. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p.1-40.
- Redhead S, Seifert K, Vilgalys R, Moncalvo J.M. 2000. *Rhacophyllus* and *Zerovaemyces*. Teleomorphs or Anamorphs? *Taxon*, Vol. 49 (4): 789-798.
- Reijnders A.F.M, Moore D. 1985. Developmental biology of agarics - an overview. In *Developmental Biology of Higher Fungi*. D. Moore, L.A. Casselton, D.A. Wood, J.C. Frankland eds. pp. 581-595. Cambridge, UK: Cambridge University Press. ISBN-10: 0521301610, ISBN-13: 978-0521301619.
- Righi, C; Pereira, A; Silveira, M; Rodrigues, C; Teramoto, E; Favarin, J. 2008. Coffee water use in agroforestry system with rubber trees. *Árvore*, Viçosa-MG, Vol 32 (4):781-792.
- Rivillas-Osorio, C. Castro-Toro, A. 2011. Ojo de Gallo o Gotera del Cafeto (*Omphalia flavida*): Enfermedad severa en algunas regiones cafeteras de Colombia, asociada a eventos climáticos fríos como “La Niña”. *Boletín Técnico* 37. CENICAFE. Colombia. 24p.
- Robert, A. 1999. El ojo de gallo (*Mycena citricolor*), una enfermedad muy importante en el cultivo de café de altura en Costa Rica. In “Memoria” XI Congreso Agronómico /IV Congreso Nacional de Fitopatología. p.13-15.
- Romero A. 2006. Aporte de biomasa y reciclaje de nutrientes en seis sistemas agroforestales de café (*Coffea arabica* var. Caturra), con tres niveles de manejo. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 128 p.
- Saccardo P.A. 1887. *Mycena citricolor*. *Sylloge fungorum*. Vol 5: 263.
- Schroth, G; Krauss, U; Gasparotto, L; Duarte, JA; Vohland, K. 2000. Pests and diseases in agroforestry systems of the humid tropics. *Agroforestry Systems* 50: 199-241.
- Salas J.A, Hancock J.G. 1972. Production of the Perfect Stage of *Mycena citricolor* (Berk. and Curt.) Sacc. *HILGARDIA* 41(9): 213-234
- Samayoa JO; Sánchez V. 2000. Importancia de la sombra en la incidencia de enfermedades en café orgánico y convencional en Paraíso, Costa Rica. *Agroforestería en las Américas*. 7(26): 34-36.

- Samper M. 1999. Trayectoria y viabilidad de las caficulturas centroamericanas. *In* Bertrand, B; Rapidel, B.eds. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. IICA, San José, Costa Rica. p. 1-68.
- Santacreo R. 2001. Variedades y mejoramiento genético del café. *In* Manual de caficultura. 3ed. IHCAFE. Tegucigalpa M.D.C., Honduras. p. 23-40.
- Seas-Carvajal C, Avalos G. 2013. Distribution of bioluminescent fungi across old-growth than secondary tropical rain forest in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)* Vol. 61 (2): 531-537.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2014. Ficha Técnica No.54 Ojo de gallo *Mycena citricolor* (Berkeley & Curtis). SAGARPA. México. 9p.
- Sequeira L.1952. Studies on *Omphalia flavida*, the agent of the American leaf spot disease of coffee. Ph.D. Thesis, Harvard Univ. 288 pp. *Fuente original*: Salas J.A, Hancock J.G. 1972. Production of the Perfect Stage of *Mycena citricolor* (Berk. And Curt.) Sacc. *HILGARDIA* 41(9): 213-234.
- Sequeira L. 1954. Nuclear phenomena in the basidia and basidiospores of *Omphalia flavida*. *Mycologia* 46:470-83.
- Sequeira, L; Steeves, TA. 1954. Auxin inactivation and its relation to leaf drop caused by the fungus *Omphalia flavida*. *Plant Physiol.* 29:11-16.
- Sequeira, L. 1958. The host range of *Mycena citricolor* (Berk and Curt) Sacc. *Turrialba* Vol. 8(4): 136-147.
- Solórzano, L. 1987. Evaluación en campo de dosis de un fungicida a base de yodo en el combate de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) (Berk & Curt) Sacc. en cafeto. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 37 p.
- Sotomayor, I; Duicela, L.1993. Botánica. *In* Manual del cultivo del café. Estación experimental tropical Pichilingue. p. 19-20.
- Staver, C; Guharay, F; Monterroso, D; Muschler, RG. 2001. Designing pest-suppressive multistrata perennial crop systems: shade-grown coffee in Central America. *Agroforestry Systems* 53: 151–170.
- Tewari, JP. 1990. Mecanismo de patogénesis y combate del ojo de gallo del cafeto causado por *Mycena citricolor*. *In* Taller regional sobre roya, ojo de gallo y otras enfermedades del cafeto. San José, Costa Rica. 17-20 jul. *Sólo resumen*.
- Tropicos. 2015. *Coffea arabica*. Consultado 25 may. 2015. Disponible en <http://www.tropicos.org/Publication/1071>
- Uribe, H. 1946. La gotera el café. Monografía. Curso Fitopatología. Facultad Nacional de Agronomía. Medellín, Colombia. 249-260.

- Urtiaga R. 1986. Índice de enfermedades de Venezuela y Cuba. Lara. Venezuela. p.202.  
*Fuente original:* De la Iglesia D, Cascaret L.2000. Especies hospedantes de *Mycena citricolor* (Berk., et Curt.) Sacc. en plantaciones de cafeto (*Coffea arabica* L.). Fitosanidad. Vol. 4 (1-2):21-22.
- Vargas, E. 1984. Interacción de tratamiento biológico y químico en el combate del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el cafeto. Agronomía Costarricense 8 (2): 91-97.
- \_\_\_\_\_, González M, Umaña G, Vargas L. 1990. Nuevas alternativas de combate químico del ojo de gallo (*Mycena citricolor*). 12avo Simposio sobre Caficultura Latinoamericana. IICA, Costa Rica. p. 425.
- Vargas, LG. 2004. Bases epidemiológicas para el desarrollo de un sistema de pronóstico en ojo de gallo (*Mycena citricolor* Berk. y Curt) Sacc. en cafeto (*Coffea arabica*). Tesis M.Sc. San José, CR. UCR. 118p.
- Virginio, E; Abarca, S. 2008. Cafetales para servicios ecosistémicos, con énfasis en el potencial de sumideros de carbono. El caso de cooperativas cafetaleras afiliadas a COOCAFE Costa Rica. Informe final. CATIE- FUNCAFOR- COOCAFE-OIKOCREDIT. Consultado 02 may. 2011. Disponible en <http://www.coocafe.com/cafeforestal/docs/cafe-servicios-ecosist-co2.pdf>
- Wang, A.1988. Variation in *Mycena citricolor* on coffee en Costa Rica. Tesis M.Sc. Edmonton, Alberta. 100p.
- \_\_\_\_\_, Arauz, LF. 1999. Aplicación de principios epidemiológicos para el combate de ojo de gallo en cafeto. In “Memoria” XI Congreso Agronómico /IV Congreso Nacional de Fitopatología. p. 9-12.
- \_\_\_\_\_, Avelino, J. 1999. El ojo de gallo (*Mycena citricolor*). In Bertrand, B; Rapidel, B.eds. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. IICA, San José, Costa Rica. p. 243-260.
- Webster J, Weber R. 2007. Introduction to Fungi. 3ed. Cambridge University Press. 701p.
- Weitz H, Ballard A.L, Campbell C.D, Killham K. 2001. The effect of culture conditions on the mycelial grow than luminescence of naturally bioluminescent fungi. FEMS Microbiology Letters 202:165-170.
- Weitz H, Ballard A.L, Campbell C.D, Killham K. 2002. Development of a novel, bioluminescence-based, fungal bioassay for toxicity testing. Environmental Microbiology 4(7): 422–429.
- Wellman, F. 1950. Dissemination of *Omphalia* leaf spot of coffee. Turrialba 1(1):12-27.
- Wolf A, Wolf T. 1947. The fungi. Vol 1. Wiley Press. 976p.
- Zamora K. 2012. Descripción química y microbiológica de lixiviados y téis de vermicompost y su efecto en la supresión de la enfermedad “ojo de gallo” (*Mycena citricolor* Berk y Curt) Sacc, en hojas de cafeto (*Coffea arabica* L.). Tesis Lic. San José, CR. UCR. 87p.
- Zhishu B, Guoyang Z, Taihui L. 1993. The macrofungus flora of China’s Guangdong Province. The Chinese University Press. Hong Kong. p343.

## Ubicación y descripción general de las áreas de estudio

El trabajo se compuso de pruebas de laboratorio, invernadero y campo. Las etapas de invernadero y laboratorio se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Agronomía de la Universidad de Costa Rica. Las pruebas de campo se llevaron a cabo en la zona de Los Santos, en ocho fincas situadas en los cantones de Dota (9°35'10"N, 83°54'26"O) ubicado a 1 548 msnm y Tarrazú (9°40'0"N, 84°2'0"O) a una altitud de 1 429 msnm, ambos situados en la provincia de San José. Para el inventario de especies de sombra se recopilaban datos de 27 fincas, incluidas las ocho donde se establecieron los ensayos.



**Figura 1.20.** Ubicación de la zona de estudio.

Las fincas fueron identificadas según la codificación utilizada en investigaciones previas realizadas por el Instituto Earthwatch<sup>7</sup>, el cual facilitó la red de cafetaleros con disposición de colaborar en la investigación.

<sup>7</sup> El Instituto Earthwatch es una ONG que contaba con un Centro de Investigación en Producción Sostenible de Café en Sistemas Agroforestales y que trabajó durante 7 años en la zona de Los Santos.

Dependiendo del objetivo del ensayo se ubicaron y seleccionaron las parcelas experimentales (Cuadro 2 y Cuadro 3).

**Cuadro 2.** Identificador, ubicación y actividades realizadas en las fincas donde se realizaron los estudios. Zona de Los Santos, Costa Rica, 2011-2014.

<b>Identificador de finca</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Actividad*</b>	<b>Observaciones</b>
CAT	El Rodeo, San Marcos de Tarrazú	1,3,4,6	Centro Agrícola Cantonal de Tarrazú. Manejo convencional
CO	Santa María de Dota	1,3,4,6	Finca Modelo de la Cooperativa de Cafetaleros de Santa María de Dota.
FI	Guadalupe, Tarrazú	3,4,6	Finca de productor en proceso de certificación Rain Forest Alliance. Bajo consumo de insumos químicos
VB44	Vara Blanca, Santa María de Dota	1,2,3	Manejo convencional
G7	San Cayetano, San Marcos de Tarrazú	1,2,3,4,6	Finca de bajo consumo de insumos químicos, previamente orgánica
G11	San Luis, San Pedro de Tarrazú	1,2,3,5	Manejo convencional
G15	El Rodeo, San Marcos de Tarrazú	1,2,3,5	Manejo convencional
G31	San Guillermo, Tarrazú	1,2,3,5	Manejo convencional

\*Se especifican en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Código de la actividad, descriptor y objetivo relacionado a las actividades realizadas en campo. Zona de Los Santos, Costa Rica, 2011-2014.

<b>Código de actividad</b>	<b>Descriptor</b>	<b>Objetivo relacionado</b>
<b>1</b>	Recolección de follaje	Identificar y cuantificar las fuentes de inóculo, su viabilidad y eficacia infecciosa.
<b>2</b>	Recolección de suelo y hojarasca fresca	Identificar y cuantificar las fuentes de inóculo, su viabilidad y eficacia infecciosa.
<b>3</b>	Inventario de árboles de sombra	Identificar y cuantificar las fuentes de inóculo, su viabilidad y eficacia infecciosa.
<b>4</b>	Remoción de hojarasca	Determinar el impacto del inóculo primario sobre el desarrollo de la epidemia y la tasa de infección.
<b>5</b>	Aplicación de <i>Trichoderma</i>	Diseñar dos opciones de manejo agroecológico que incluyan las alternativas biológica y cultural, en diferentes momentos de la epidemia, para tratar de disminuir la enfermedad.
<b>6</b>	Registro de datos meteorológicos	Correlacionar el efecto del microclima (temperatura, humedad relativa, precipitación y período de mojadura foliar) con el desarrollo de la epidemia.

## Capítulo 2. Identificación de fuentes de inóculo primario y determinación de la patogenicidad del inóculo.

---

### Resumen

Hasta ahora no se conoce la ubicación de la mayor fuente de inóculo inicial que da inicio a la epidemia de ojo de gallo cada año, tampoco se tiene información sobre el período de sobrevivencia de este inóculo en relación a su ubicación, ni del nivel de patogenicidad de los propágulos de acuerdo a la fuente, entre otros aspectos relevantes en el ciclo de vida del patógeno y el ciclo de la enfermedad. Si se conociera la mayor fuente de inóculo, se podría trabajar en estrategias que logren reducir su impacto al máximo. Por lo que, en esta investigación se trató de identificar las posibles fuentes, así como su patogenicidad. Se registraron datos de 27 fincas durante el período comprendido entre noviembre 2011 a diciembre 2014. Se ejecutaron actividades en campo, invernadero y casa de sarán, además de laboratorio. Se realizaron colectas de suelo y hojarasca, follaje de cafeto con lesiones producidas el año anterior al muestreo y follaje de plántulas voluntarias de café y de vegetación acompañante con síntomas de la enfermedad, para determinar la incidencia, cuantificar el inóculo residual y determinar la presencia de inóculo primario. No se logró recuperar inóculo a partir de suelo ni hojarasca, pero se recuperaron 15 cepas de *M.citricolor* a partir de vegetación acompañante. Se hallaron 9 géneros de árboles hospedantes de *Mycena citricolor*, entre ellos *Erythrina poeppigiana*, *Persea americana* y *Ricinus communis*; además de 32 arvenses; del total de géneros 13 son nuevos registros. Se caracterizaron 250 lesiones de campo presentes en café Caturra y Catimor-CR95, *Cissus verticillata*, *Anredera cordifolia* y *Bryophyllum calycinum*, las lesiones en arvenses presentaron mayor diámetro (0,88 cm, 0,90 cm, y 1,18 cm respectivamente) que las de cafeto (0,63 cm y 0,70 cm respectivamente). Se registró un promedio de geminíferos/lesión de 10,5, 5,0 y 22,5 para las arvenses de acuerdo al orden citado; mientras que no se contabilizaron geminíferos en las lesiones presentes en cafeto. Se evaluaron 17 cepas del patógeno, se caracterizó su desarrollo *in vitro* y se determinó el Índice de Patogenicidad (IP) tanto de inóculo proveniente de campo como de inóculo producido en laboratorio, sobre follaje de Caturra de 2 años. La cepa menos patogénica fue la recuperada de *E. poeppigiana* (IP=0) y la más patogénica la extraída de *B. calycinum* (IP=18,87), la cepa de Catimor-CR95 fue más patogénica que la de Caturra (IP=9,94 vrs IP=3,66). La patogenicidad de las cepas estudiadas se disminuyó *in vitro*, por lo que se recomienda realizar este tipo de estudios con inóculo proveniente directamente de campo.



## Introducción

La mayor limitante en el manejo del ojo de gallo es la escasez de estudios epidemiológicos. Se reportan solamente tres estudios a nivel mundial de importancia en el tema, todos realizados en Costa Rica; el primero llevado a cabo por Wellman (1950) el cual fue un estudio pionero sobre aspectos de dispersión, pasaron más de 50 años hasta que Vargas (2004), realizara otro estudio sobre la epidemiología de este hongo, enfocado esta vez en el desarrollo de un sistema de pronóstico y finalmente, Avelino *et al.* (2007) publica acerca de las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, enfocado en las prácticas de cultivo y la topografía.

Por esto, aún existen muchas interrogantes, no se conocen claramente las etapas del ciclo de esta enfermedad, no se sabe cuál es la ubicación de la mayor fuente de inóculo inicial, tampoco se tiene información sobre el período de sobrevivencia de este inóculo en relación a su ubicación o fuente, ni el tiempo de infectividad de los propágulos de acuerdo a la fuente, entre otros aspectos relevantes en el ciclo de vida del patógeno y el ciclo de la enfermedad.

De acuerdo a varios autores, la mayor fuente de inóculo inicial es el inóculo presente en las lesiones producidas el año anterior, denominado inóculo residual (IR), el cual se mantiene en estado latente en lesiones viejas durante la época seca y activa su crecimiento cuando entran las primeras lluvias (Carvajal 1939a, Wellman 1950, Ramírez 1994, Avelino *et al.* 1999).

Se conoce también que esta enfermedad es de tipo policíclico pero de desarrollo relativamente lento, debido a que presenta una tasa de infección aparente ( $r$ ) baja, 0,015 a 0,020 (Arauz 1998, Wang y Arauz 1999).

El valor de  $r$  significa un aumento en la cantidad de inóculo o de enfermedad (incidencia o severidad) y puede ser considerado como una medida del riesgo ( $R$ ) de una enfermedad. Ha sido calculado para muchas enfermedades y varía entre 0,1 a 0,5 unidades por día para enfermedades foliares policíclicas y de 0,02 unidades por día hasta 1,60 unidades por año para enfermedades monocíclicas. Este parámetro está determinado por la susceptibilidad del hospedero, la agresividad del patógeno y las condiciones ambientales (Campbell y Madden 1990, Achicanoy 2000, Agrios 2005, Nutter 2007).

En enfermedades con valor de  $r$  bajo el desarrollo de la epidemia disminuye significativamente al reducir la cantidad de inóculo inicial. Se menciona que para una enfermedad con  $r$  de 0,02 se puede retrasar la epidemia 11 días si se logra disminuir el inóculo inicial en 20%; puede retrasarse 35 días con una reducción de inóculo (a partir de la fuente) de un 50%; 80 días con reducción del 80% y hasta en 230 días si se lograra disminuir el 99% del inóculo inicial. Al contrario, en enfermedades policíclicas con valores de  $r$  típicos, como la roya anaranjada, la cual tiene una  $r$  de 0,12 unidades por día, la reducción del inóculo no afecta de forma significativa el desarrollo de la epidemia; para estas enfermedades la disminución del 50% del inóculo inicial solo representa un retraso de 7 días en la epidemia (Kushalappa y Ludwing 1982, Nutter 2007).

Así, entre más baja sea  $r$ , más efectivas se tornan las prácticas sanitarias de eliminación de inóculo, permitiendo retorno de la inversión, ya que se mantiene el riesgo de la enfermedad por debajo del umbral económico (Nutter 2007). Al respecto, Wang y Arauz (1999) recalcan que, si se consiguiera reducir el inóculo primario y disminuir la tasa de infección, se lograría retardar sustancialmente la epidemia de ojo de gallo.

Para reducir el impacto del inóculo primario del ojo de gallo, es de suma importancia conocer dos aspectos: primero, si efectivamente la mayor fuente de inóculo lo constituyen las lesiones producidas el año anterior que continúan presentes en la planta y segundo, determinar si existen otras fuentes de importancia. Es decir, si se mantiene en plantas de café o si se encuentra sobreviviendo como habitante en el suelo/hojarasca o en lesiones de hospederos alternos como árboles o arvenses. Si se encontrara en todas las anteriores, es relevante tratar de determinar la importancia relativa de las fuentes de inóculo, para luego trabajar en estrategias que logren reducir su impacto al máximo.

Al respecto se conoce que el género *Mycena* es uno de los géneros predominantes dentro de las comunidades de agaricales saprófitos presentes en la hojarasca y madera de los pisos de bosques húmedos tropicales y que *M. citricolor* puede atacar a más de 214 hospederos en 78 familias de plantas (Carvajal 1939b, Sequeira 1958, De la Iglesia y Cascaret 2000, Pacheco 2012, Hernández 2009). Lo que hace pensar que es viable que parte del inóculo que inicia una nueva epidemia esté localizado en la hojarasca presente en el cafetal y/o en la vegetación

que acompaña al cultivo. Sin embargo, no se tienen registros de la cuantificación del aporte de estas posibles fuentes al nivel de inóculo inicial de la enfermedad.

Por lo que se planteó esta investigación con el fin de cuantificar el nivel de inóculo residual en plantas de cafeto, identificar fuentes diferentes al cultivo y cuantificar su impacto mediante la patogenicidad de los propágulos.

## **Materiales y Métodos**

Se registraron datos de 27 fincas durante el período comprendido entre noviembre 2011 a diciembre 2014. Se realizaron actividades en campo, invernadero y casa de sara, además de laboratorio. A continuación se detallan los procedimientos utilizados.

### **1. Cuantificación de la incidencia de la enfermedad y del nivel de inóculo inicial en cafeto**

Se seleccionaron las áreas y se caracterizaron las plantas de estudio; se cuantificó la incidencia de la enfermedad y el nivel de inóculo inicial en dos momentos, noviembre 2011 y octubre 2012.

#### **a. Selección de parcelas para muestreo**

En las fincas CAT, CO, VB44, G7, G11, G15 y G31 se eligieron 3 parcelas no adyacentes, de aproximadamente 100 m<sup>2</sup>, que presentaban históricamente la enfermedad, según el productor.

Para contar con una descripción de las plantas seleccionadas para la cuantificación de la incidencia se midió su altura (cm) desde la base del tronco principal hasta la parte más alta y la cantidad de tallos en producción.

#### **b. Cuantificación de la incidencia de la enfermedad y del nivel de inóculo residual e inicial**

Se midió a finales de noviembre 2011 y finales de octubre 2012, con la finalidad de documentar la presencia de la enfermedad en las parcelas de estudio y para determinar el nivel de inóculo residual de esos años.

Se eligieron 5 plantas contiguas y se seleccionaron, mediante muestreo arbitrario, 5 bandolas ubicadas en el tercio inferior de cada una de las plantas. Se registró la cantidad total de hojas presentes, cantidad de hojas con síntomas de ojo de gallo, la cantidad de lesiones por hoja y la cantidad de geminíferos (activos o no) por lesión, lo que permitió determinar la incidencia y el inóculo residual por parcela.

En julio 2013 se realizó una descripción de 150 hojas enfermas de cafeto en producción, colectadas en las fincas CAT, CO y G11 (50 hojas por finca), se hizo un recuento de lesiones totales, lesiones viejas, lesiones nuevas, lesiones viejas con geminíferos, lesiones nuevas con geminíferos, geminíferos por lesión vieja y geminíferos por lesión nueva, con el fin de conocer el nivel de inóculo inicial.

Además, se realizaron aislamientos del patógeno a partir de lesiones viejas y lesiones nuevas presentes en las 3 fincas, para determinar la presencia del hongo en dichas lesiones.

## **2. Identificación de fuentes de inóculo diferentes al cultivo**

### **a. Suelo y hojarasca**

Se procedió a describir la homogeneidad del piso del cafetal en las parcelas seleccionadas en el punto anterior.

Se determinó visualmente el porcentaje de hojarasca, vegetación y suelo desnudo por medio de la colocación de una cuadrícula de  $1\text{m}^2$ , con divisiones internas de  $10\text{cm}^2$ ; la cual se ubicó en 4 sitios en dirección de los puntos cardinales, tomando como referencia una de las plantas usadas para cuantificación de incidencia de la enfermedad.

### **i. Colecta de muestras**

Se realizaron colectas en noviembre del 2011, marzo y octubre del 2012 y mayo del 2013, en las mismas fincas y plantas del punto 1.a.

Por cada una de las 3 áreas seleccionadas por finca se tomaron 5 submuestras (75 en total para las 5 fincas) y se mezclaron para formar una muestra compuesta para cada área. Cada submuestra consistió de un volumen cercano a la mitad de un saco de 50 Kg, de capa superficial de hojarasca fresca o de suelo según correspondiera. Primero se tomaba la hojarasca ubicada debajo de cada planta, se mezclaba la correspondiente a las 5 plantas de cada parcela y se ubicaba en un saco rotulado con código de finca y parcela. Luego con ayuda de un palín se tomaba suelo alrededor de cada una de las plantas a una profundidad aproximada de 15 cm, se mezclaban las submuestras de las 5 plantas y se colocaba en otro saco rotulado igual que la hojarasca.

### **ii. Acondicionamiento y mantenimiento de las muestras**

Todas las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Fitopatología. Tanto las muestras de suelo como de hojarasca fresca se separaron en tres grupos, el primero se mantuvo por un período de 4 semanas en cámara húmeda, el segundo por un período de tres meses en condiciones de invernadero con aspersión diaria. El tercer grupo se usó como sustrato de siembra de plantas de café, variedad Caturra, de un año de edad, con la finalidad de determinar si existía inóculo capaz de infectar las plantas. Estas plantas permanecieron un año bajo las condiciones del invernadero del Laboratorio de Fitopatología.

Para las muestras de los tres grupos se procedió a determinar la presencia de geminíferos y basidiocarpos, tanto en el suelo y hojarasca como en las plantas de café. Las observaciones se realizaron cada 15 días.

El tercer grupo de muestras de la colecta realizada en el 2013 se utilizó como sustrato para plantas variedad Catimor-CR95 y se mantuvo un año en condiciones de casa de sarán en la finca CAT (Centro Agrícola Cantonal de Tarrazú). Se realizaron observaciones cada 15 días y se registraron los valores de temperatura y humedad relativa con un sensor onset Pro v2 marca HOBO.



**Figura 2.1.** Mantenimiento de muestras. **A)** Cámaras húmedas, **B)** Hojarasca mantenida en invernadero, **C)** Mantenimiento de plantas en invernadero y **D)** Mantenimiento de plantas en casa de sarán.

### iii. Aislamiento del patógeno

Se realizaron tres procedimientos.

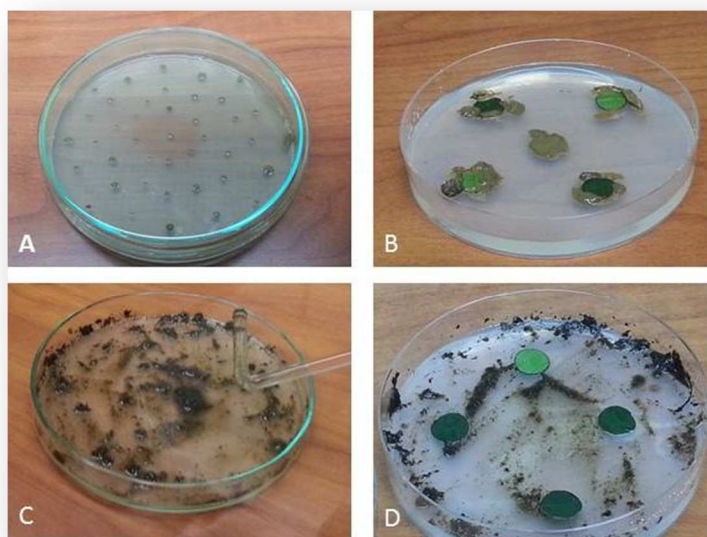
1) Aislamiento a partir de secciones de tejido: de las muestras de hojarasca del primer grupo se tomaron aquellas hojas que presentaban síntomas de ojo de gallo y se procedió a realizar aislamientos en medio de cultivo papa-dextrosa-agar al que se le adicionó extracto de levadura al 2% (PDA+Lev). Los cultivos se mantuvieron en cámaras de incubación por 7 días, a la oscuridad, a  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  y 65% HR.

2) Recuperación por medio de centrifugación: se tomaron alícuotas de 10g suelo y 10g de hojarasca del primer grupo y se mezclaron, separadamente, con 90ml de agua peptonada; después se licuó la mezcla para homogenizar. Una vez realizado esto, se centrifugó con centrífuga SIGMA 204 a una velocidad de 4 000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se procedió a sembrar 20 puntos de 10 $\mu$ l del sedimento en Platos Petri de 15cm de diámetro. Se realizaron 5 repeticiones en los medios de cultivo PDA, agar-agua (AA) y HC. Se realizaron

5 repeticiones para cada finca, para un total de 50 platos, los cuales fueron incubados a la oscuridad, por un período de 7 días, a una temperatura de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  y 65% HR.

3) Recuperación por medio de licuado: se tomaron alícuotas de 10g suelo y 10g de hojarasca del primer grupo y se mezclaron, cada uno, con 90ml de agua peptonada; después se licuó la mezcla para homogenizar. Una vez realizado esto, se tomó 1ml de la suspensión y se distribuyó en la superficie de Platos Petri de 15cm de diámetro adicionados con los medios de cultivo PDA, AA y HC. A cada plato se le colocaron 20 discos de hoja de café de 1cm de diámetro, las cuales fueron desinfectadas previamente por medio de un lavado con agua corriente, 30s en alcohol al 70%, 45s en hipoclorito de sodio al 1% y finalmente 3 lavados con agua destilada estéril.

Se realizaron 5 repeticiones por finca para un total de 50 platos, los cuales fueron incubados en las mismas condiciones del punto anterior.



**Figura 2.2.** Técnicas de aislamiento del patógeno. A) y B) Por medio de centrifugación, **A)** Colocación de puntos de sedimento en medio de cultivo, **B)** Colocación de sedimento y discos de follaje de café en medio de cultivo. C) y D) Por medio de licuado, **C)** Dispersión de la suspensión en medio de cultivo, **D)** Dispersión de la suspensión en medio de cultivo y colocación de discos de follaje de café.

## **b. Vegetación acompañante**

### **i. Colecta de muestras, acondicionamiento y mantenimiento de muestras**

Se colectaron hojas de cafeto en producción de las variedades Caturra y CR95 (Catimor), de cafeto voluntario (variedad no identificada), de árboles de sombra y arvenses que exhibieran síntomas o signos de ojo de gallo.

Las muestras con síntomas pero sin signos fueron envueltas en papel toalla húmedo y colocadas en una bolsa plástica, protegidas de la luz y el calor. Aquellas que presentaban signos fueron colocadas cuidadosamente, en cámaras húmedas elaboradas en cajas plásticas con compartimientos, de manera que el roce entre hojas fuese el mínimo, para evitar posibles daños a los geminíferos. Fueron trasladadas al laboratorio en el menor tiempo posible, donde se procedió a colocarlas en cámaras húmedas con saturación de humedad. Se ubicaron en una habitación con condiciones de 55%HR y  $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### **ii. Caracterización de las lesiones**

De las fincas CAT y CO se seleccionaron 5 hospederos con síntomas y se describieron 250 lesiones (50 lesiones por fuente de inóculo) colectadas en el mismo período. Se registró la forma, coloración, diámetro promedio en cm (considerando mediciones del diámetro mayor y menor de cada lesión), la presencia de anillo y su ancho (cm), así como la cantidad de geminíferos activos presentes al momento de la colecta.

### **iii. Aislamiento del patógeno**

Se procedió a desinfectar lesiones provenientes de todos los hospederos hallados, incluyendo cafeto var. Caturra, por medio de un lavado con agua corriente, 30s en alcohol al 70%, 45s en hipoclorito de sodio al 1% y finalmente 3 lavados con agua destilada estéril. No se realizó desinfección de las muestras que presentaban signos (geminíferos).

Se realizaron aislamientos de secciones de la zona de avance de las lesiones y siembra directa de los geminíferos de las muestras que presentaban signos, ambos en PDA+Lev. Todos los cultivos se mantuvieron por 7 días a la oscuridad, a una temperatura de  $\pm 23^{\circ}\text{C}$  y  $\pm 65\%$  HR. Este período de incubación promueve el desarrollo vegetativo del hongo, una vez



transcurrido este tiempo, los aislamientos son expuestos a la luz para estimular la producción de geminíferos.

#### **iv. Caracterización de los aislamientos**

Se procedió a caracterizar 13 aislamientos recuperados de cultivo, árboles de sombra y arvenses, de ahora en adelante denominados cepas del patógeno.

Se registró la velocidad de crecimiento (VC), la capacidad de producción de geminíferos en PDA + lev, así como una descripción del micelio mediante su apariencia y densidad, para cada cepa recuperada de *M. citricolor*.

Para determinar VC se colocaron discos de 1cm de diámetro del medio de cultivo conteniendo micelio de cada cepa de 8 días de edad en el centro de 5 Platos Petri de 8 cm de diámetro para cada cepa. Se incubaron por 7 días a la oscuridad, a temperatura de  $\pm 23^{\circ}\text{C}$  y  $\pm 65\%$  HR.

Cada 2 días se midió el diámetro vertical y horizontal de cada colonia para calcular el diámetro de crecimiento promedio por día, con estos datos se calculó la  $VC = (\text{Crecimiento final} - \text{Crecimiento inicial}) / \text{tiempo de incubación}$ . Las mediciones se realizaron por 8 días, momento en el cual los aislamientos habían cubierto por completo el medio de cultivo.

Para inducir la producción de geminíferos las cepas fueron expuestas a una intensidad lumínica  $\leq 450$  lux, bajo condiciones  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y 85%HR por un período mayor de 7 días. En caso de que no se lograra el desarrollo, se procedió a colocar 8 discos de follaje de café de 1 cm de diámetro por plato Petri, previamente desinfectados de la misma forma que en el punto 2.b.iii.

La capacidad de producción de geminíferos se determinó por medio del recuento de estructuras por disco de follaje por repetición y el porcentaje de área del plato Petri cubierta por los geminíferos producidos directamente del micelio

Para determinar el porcentaje de área se midió el área total de crecimiento del aislamiento y el área con presencia de geminíferos a los 8, 15, 30 y 45 días de edad, con estos datos se calculó el porcentaje de área ocupado por las estructuras en cada fecha de evaluación. El

cálculo de las áreas se realizó mediante el programa para procesamiento y análisis de imágenes Image J.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y de comparación entre medias (Tukey HSD) para la velocidad de crecimiento. Los datos fueron analizados con el programa R para análisis estadístico, mediante el editor RStudio. Las pruebas realizadas fueron el análisis de varianza ANOVA, Tukey HSD y CHI CUADRADO ( $\alpha = 0,05$ ).

### 3. Determinación de la patogenicidad del inóculo

Se realizaron dos bioensayos de inoculación en cámaras húmedas, uno con gemas provenientes de campo y otro con gemas producidas en laboratorio. Se seleccionaron siempre gemas maduras.

#### i. Bioensayo 1. Gemas directas de campo

Se colectó follaje enfermo procedente de cultivo, árboles de sombra y arvenses, que presentaban estructuras de *M. citricolor* y se acondicionó de acuerdo al punto 2.b.i, al día siguiente se procedió con la inoculación. El Cuadro 1 muestra el nombre, la fuente de inóculo y la procedencia de las cepas usadas.

**Cuadro 2.1.** Código, fuente de inóculo y procedencia de las cepas de *M. citricolor* presentes en cultivo, árboles de sombra y arvenses utilizadas en el Bioensayo 1. San José, Costa Rica, 2014.

Código	Fuente de inóculo	Procedencia
McAc	<i>A. cordifolia</i>	CAT
McBc	<i>B. calycinum</i>	CO
McCa	<i>C. arabica</i> var. Caturra	CAT
McCv	<i>C. verticillata</i>	CAT
McK	<i>C. arabica</i> var. CR95 (Catimor)	CAT
McSp	<i>S. papillosa</i>	CAT
McVol	<i>C. arabica</i> voluntario	G7

Se tomaron bandolas de plantas de café variedad Caturra de 2 años de edad, que habían sido mantenidas bajo condiciones de invernadero, se procedió a lavarlas con agua corriente y jabón líquido para eliminar residuos del riego por aspersión y contaminantes externos. Luego se secaron bajo un ventilador y se seleccionaron hojas de desarrollo intermedio lo más planas posibles, para procurar el mantenimiento de las gemas en la superficie foliar, en cada una se procedió a delimitar y numerar con marcador indeleble los puntos de inoculación.

Se colocó una gema madura por punto de inoculación en el haz de las hojas, para un total de 30 para las cepas McBc, McCv y McK, de 22 para McSp, 20 para McAc, 15 para McCa y 9 para McVol. Las bandolas inoculadas fueron colocadas en cámaras húmedas de acuerdo al punto 2.b.i.

Cada cepa fue inoculada en bandolas diferentes y colocadas en cajas distintas, de manera que no fuese posible la contaminación cruzada entre cepas. Dependiendo del tamaño de la bandola, la topografía de las hojas y la cantidad de gemas maduras por inocular, se requerían 1 ó 2 bandolas por cepa, siempre en caja distinta, pero con la misma rotulación de acuerdo a la cepa usada.

De igual forma, cada hoja de la bandola podía ser inoculada con un distinto número de gemas de la misma cepa, eso dependía del tamaño y la topografía de la hoja, así en hojas grandes y más planas se podían inocular hasta 8 gemas, 4 de cada lado de la vena central. Las cajas se revisaban cada día para garantizar saturación de humedad y mojadura foliar y se añadía agua en los casos necesarios.

El diseño de los tratamientos fue irrestricto al azar, con 7 tratamientos (las cepas) y un máximo de 30 repeticiones (los puntos de inoculación).

Los tratamientos fueron evaluados cada 2 días por un período de 4 semanas. Se registró el número de lesiones formadas, el diámetro mayor y menor de las lesiones, y la cantidad de geminíferos desarrollados en cada lesión, para cada cepa.

Se calculó el éxito de infección (%) de cada cepa, el tiempo a infección máxima, el porcentaje de gemas no viables, el porcentaje de éxito de infección de acuerdo a la colocación de la

gema (bien<sup>8</sup> vrs mal<sup>9</sup>), el diámetro promedio y máximo de las lesiones desarrolladas, el tiempo a aparición de cada lesión (período de incubación), el tiempo a máximo desarrollo de cada lesión, la velocidad de crecimiento de las lesiones, el porcentaje de lesiones no medibles debido a coalescencia, el tiempo de aparición de lesiones no medibles, la máxima cantidad de geminíferos desarrollados (inóculo secundario), el tiempo a aparición de primordios de geminíferos/lesión (periodo de latencia) y el tiempo a máxima cantidad de geminíferos totales.

Se calculó el Índice de Patogenicidad (IP) de cada cepa, tomando como referente el Índice de Agresividad Compuesto (CAI) utilizado por Pliakhnevich e Ivaniuk (2008). De acuerdo a la fórmula:

$$IP = (EI * DL * CG) / PL * PI$$

Donde:

IP: Índice de patogenicidad

EI: Éxito de infección (%)

DL: Diámetro de la lesión (promedio del diámetro máximo alcanzado)

CG: Capacidad de gemación (promedio del número de gemas producido por lesión)

PI: Período de incubación (días a aparición de lesiones)

PL: Período de latencia (días a aparición de primordios de geminíferos)

Los datos fueron analizados con el programa R para análisis estadístico y creación de gráficas, mediante el editor RStudio. Las pruebas realizadas fueron el análisis de varianza ANOVA, Tukey HSD y CHI CUADRADO ( $\alpha = 0,05$ ). Para el análisis de proporciones se usó la prueba de Marascuillo ( $\alpha = 0,05$ ).

---

<sup>8</sup> Bien: la zona frontal de la cabeza de la gema, es decir, la zona opuesta a la apófisis, debe quedar en contacto directo con la superficie foliar.

<sup>9</sup> Mal: cualquier otra posición diferente a “Bien”.

## **ii. Bioensayo 2. Gemas producidas en laboratorio**

Se utilizaron los geminíferos producidos por las cepas aisladas y caracterizadas en el punto 2.b.

Todos los aislamientos eran frescos, es decir, tenían solo una transferencia a partir del cultivo original, para evitar pérdida de patogenicidad.

Los procedimientos de establecimiento y evaluación del ensayo fueron los utilizados en el Bioensayo 1.

El diseño de los tratamientos fue irrestricto al azar, con 13 tratamientos (las cepas) y 30 repeticiones (los puntos de inoculación), excepto para la cepa McIr con 27.

Se evaluaron las mismas variables y se calcularon los mismos parámetros que en el bioensayo con gemas procedentes de campo.

De igual forma, los datos fueron analizados mediante las pruebas ANOVA, Tukey HSD, CHI CUADRADO, en RStudio. Para las proporciones se realizó la prueba de Marascuillo, todas con  $\alpha = 0,05$ .

Se compararon todas las cepas (campo y laboratorio) por medio de la determinación de tres niveles de patogenicidad (bajo, medio y alto) tomando como rango los valores mínimos y máximo de IP. Se consideraron, además, los niveles de agresividad usados por Barquero (2009) para aislamientos de café, como patrones de comparación de patogenicidad.

## **Resultados**

### **1. Cuantificación de la incidencia de la enfermedad y del nivel de inóculo residual en cafeto**

La incidencia de la enfermedad fluctuó entre 40 y 60% en el año 2011 y entre 40 y 85 % en el 2012. El 75% de las plantas muestreadas presentaron 3 lesiones por hoja en promedio en el 2011 y 2 en el 2012 (Cuadro 2.2).

La cantidad máxima de inóculo residual promedio rondó las 3,53 lesiones por hoja en el 2011 y bajó a 2,82 lesiones por hoja para el 2012(Cuadro 2.2).

**Cuadro 2.2.** Incidencia promedio (%), lesiones por hoja promedio y geminíferos/lesión promedio en las plantas muestreadas en las parcelas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, nov 2011 y oct 2012.

Finca	Parcela	Nov 2011			Oct 2012		
		Incidencia	Lesiones/hoja (IR)*	Geminíferos/lesión	Incidencia	Lesiones/hoja (IR)*	Geminíferos/lesión
<b>G7</b>	<b>1</b>	43,29±5,96	1,95±0,40	0,13±0,13	45,67±5,30	1,40±0,09	0,00±0,00
	<b>2</b>	55,32±6,86	1,89±0,30	0,28±0,11	45,67±5,30	1,60±0,15	0,00±0,00
	<b>3</b>	41,91±6,73	1,85±0,31	0,06±0,02	40,83±5,22	1,00±0,00	0,00±0,00
<b>G11</b>	<b>1</b>	54,40±5,96	1,48±0,20	0,31±0,18	42,32±6,90	1,67±0,20	1,70±0,42
	<b>2</b>	59,40±6,90	1,67±0,36	0,14±0,10	75,00±5,47	1,63±0,19	0,05±0,04
	<b>3</b>	39,60±5,25	2,91±0,63	0,33±0,13	68,69±5,91	1,57±0,20	0,29±0,11
<b>G15</b>	<b>1</b>	55,73±6,71	3,33±0,32	1,34±0,29	41,70±6,23	2,33±0,33	1,26±0,39
	<b>2</b>	46,57±5,43	3,53±0,34	0,14±0,10	78,57±5,07	1,90±0,23	0,00±0,00
	<b>3</b>	46,08±6,39	1,77±0,23	1,50±0,59	75,83±5,55	1,30±0,08	0,40±0,22
<b>G31</b>	<b>1</b>	-	-	-	54,54±6,21	2,05±0,24	0,33±0,31
	<b>2</b>	-	-	-	47,38±6,45	2,82±0,39	0,31±0,22
	<b>3</b>	-	-	-	56,64±7,03	1,53±0,12	0,00±0,00
<b>G44</b>	<b>1</b>	-	-	-	85,00±4,18	1,40±0,15	0,00±0,00
	<b>2</b>	-	-	-	56,79±6,37	2,22±0,27	0,04±0,02
	<b>3</b>	-	-	-	70,80±5,74	1,83±0,16	0,11±0,09

\*: IR= Inóculo residual

La altura de las plantas muestreadas el 2011 fue en promedio 220 cm y presentaron 2 tallos en producción. Los datos registrados en el 2012 indican un promedio de 234 cm de altura y 3 tallos en producción (Cuadro 2.3).

Las fincas que presentaron plantas de menor altura fueron la G11 y G15 con un número promedio de tallos en producción de 3,20. Las que presentaron plantas más altas fueron las fincas G31 y G44, con un promedio de tallos en producción de 2,35 (Cuadro 2.3).

**Cuadro 2.3.** Altura promedio (cm) y número de tallos en producción promedio de las 5 plantas muestreadas en cada parcela de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, nov 2011 y oct 2012.

Finca	Parcela	Nov 2011		Oct 2012	
		Altura (cm)	Tallos en producción	Altura (cm)	Tallos en producción
G7	1	213,60±8,61	1,60±0,10	197,2±3,07	4,4±0,55
	2	249,00±3,81	3,20±0,39	246,0±4,70	5,0±0,54
	3	244,80±4,91	4,20±0,29	263,4±11,53	3,2±0,18
G11	1	211,00±4,83	2,80±0,23	224,0±2,19	4,0±0,47
	2	223,80±6,19	2,60±0,16	239,6±1,21	3,8±0,24
	3	202,20±7,00	1,40±0,20	188,0±9,05	4,4±0,15
G15	1	250,00±9,89	2,60±0,24	206,8±3,17	3,6±0,30
	2	195,40±7,12	3,00±0,22	269,4±5,89	2,6±0,19
	3	144,67±15,06	2,80±0,23	227,0±1,70	2,2±0,14
G31	1	-	-	251,8±1,64	1,8±0,21
	2	-	-	248,2±2,83	3,0±0,22
	3	-	-	235,6±3,89	3,0±0,20
G44	1	-	-	226,0±5,49	2,2±0,07
	2	-	-	240,6±6,98	2,6±0,19
	3	-	-	253,0±2,60	1,6±0,15

De acuerdo a la caracterización de lesiones en cafeto realizada a inicios de la época lluviosa del 2013 se registró mayor cantidad de lesiones viejas que nuevas por hoja. Así mismo, hubo mayor cantidad de lesiones viejas con geminíferos en las fincas CAT y CO; y mayor cantidad de lesiones nuevas con geminíferos en la finca G11 (Cuadro 2.4).

La finca que presentó mayor cantidad de geminíferos por lesión vieja fue CAT y la que registró mayor cantidad de estructuras por lesión nueva fue G11 (Cuadro 2.4).

No fue posible recuperar *M. citricolor* a partir de lesiones viejas. Se eligió un aislamiento recuperado de lesiones nuevas de la finca CAT para realizar las pruebas *in vitro*.

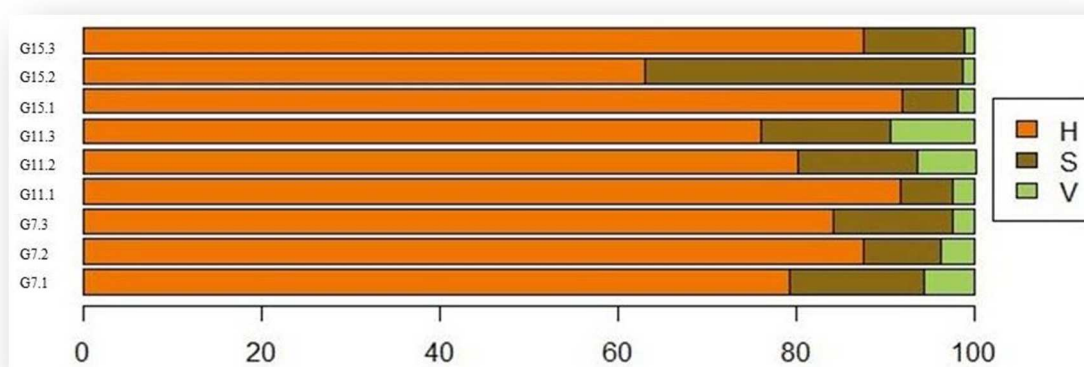
**Cuadro 2.4.** Lesiones totales, porcentaje de lesiones viejas y nuevas, porcentaje de lesiones viejas con geminíferos y lesiones nuevas con geminíferos, promedio de geminíferos por lesión vieja y promedio de geminíferos por lesión nueva en 150 hojas de cafeto muestreadas en tres fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, Julio 2013.

	Finca		
	CAT	CO	G11
<b>Lesiones totales</b>	274	236	222
<b>Lesiones viejas</b>	66,60±6,14	76,91±5,71	52,16±6,80
<b>Lesiones nuevas</b>	33,40±6,14	23,09±5,71	47,36±6,80
<b>Lesiones viejas con geminíferos</b>	16,60±5,26	13,90±4,89	5,29±3,16
<b>Lesiones nuevas con geminíferos</b>	3,32±2,53	3,14±2,47	14,90±5,04
<b>Geminíferos/lesión vieja</b>	0,99±0,44	0,65±0,30	0,48±0,33
<b>Geminíferos/lesión nueva</b>	0,25±0,29	0,16±0,14	1,71±0,71

## 2. Identificación de fuentes de inóculo

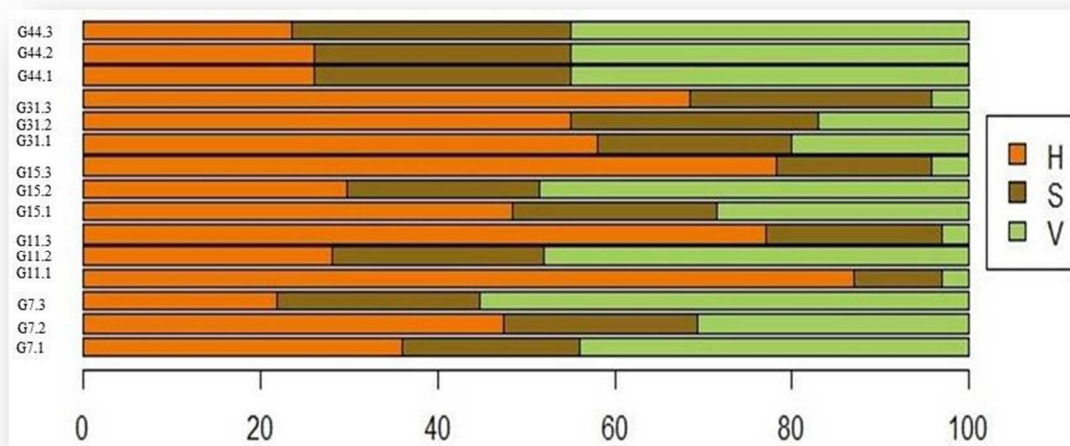
### a) Suelo y hojarasca

La cantidad de hojarasca fue cercana al 80% en todos los puntos muestreados en el 2011, excepto en la parcela 2 de la finca G15, G15.2 (Figura 2.3). Los resultados muestran una composición diferente para los puntos descritos en el 2012, donde la mayoría no sobrepasan el 60% de hojarasca y se registró mayor cantidad de vegetación en las parcelas (Figura 2.4).



**Figura 2.3.** Composición del piso del cafetal expresada como porcentaje promedio de hojarasca (H), suelo desnudo (S) y vegetación (V), en 1m<sup>2</sup> en las áreas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, nov. 2011.





**Figura 2.4.** Composición del piso del cafetal expresada como porcentaje promedio de hojarasca (H), suelo desnudo (S) y vegetación (V), en 1m<sup>2</sup> en las áreas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, oct. 2012.

No se recuperó el patógeno a partir de ninguna de las muestras colectadas, ni bajo ninguna de las técnicas de aislamiento in vitro.

Las plantas que fueron sembradas en sustrato de suelo y hojarasca colectado en las fincas y mantenidas en invernadero o casa de sarán, tampoco presentaron síntomas de ojo de gallo. Tampoco las arvenses presentes en esta área presentaron síntomas (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Estado de las plantas luego de permanecer un año en casa de sarán en la finca CAT. **A)** Apariencia general de las plantas. **B)** Lesiones presentes: flecha blanca *Cercospora coffeicola*, flecha negra *Colletotrichum gloeosporioides*.

En la hojarasca mantenida en cámaras húmedas e invernadero se desarrollaron algunos basidiomicetes y xilariales (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Hongos desarrollados en cajas con hojarasca mantenidas en el invernadero. **A)** y **B)** Agaricales. **C)** Rizomorfos de basidiomicete. **D)** Xylarial.

## **b) Vegetación acompañante: árboles y arvenses**

### **i. Colecta de muestras, acondicionamiento y mantenimiento de muestras**

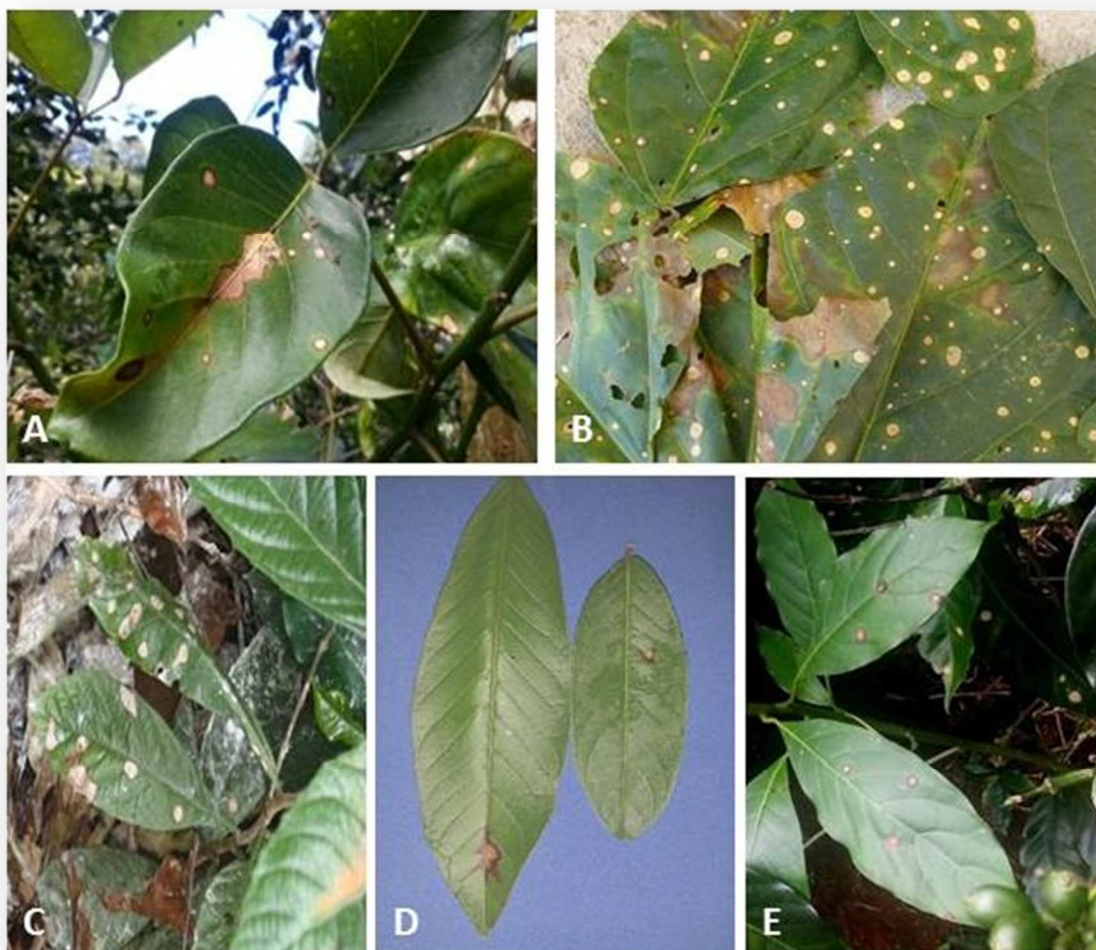
Se registraron 24 géneros de árboles de sombra presentes en las 27 fincas visitadas, se identificaron 23, distribuidas en 16 familias botánicas, siendo Leguminosae y Myrtaceae las familias con más representantes, 4 y 3, respectivamente (Cuadro 2.5).

De acuerdo al porcentaje de uso como sombra, predomina el poró presente en el 96% de las fincas, en segundo lugar las musáceas (banano, guineo o plátano) con 89% de aparición y con un 22% de presencia el aguacate.

De los 24 géneros, 9 son hospederos de *M. citricolor*, los cuales pertenecen a 7 familias, a saber, Anonaceae, Leguminosae, Myrtaceae, Moraceae, Rosaceae, Lauraceae y Euphorbiaceae.

De los 4 representantes de la familia Leguminosae, se hallaron 3 géneros con presencia de síntomas y signos de ojo de gallo; poró, vainillo y uno no identificado (Cuadro 2.5).

El aguacate, uno de los árboles más usados como sombra, también se determinó como hospedero de *M. citricolor*.



**Figura 2.7.** Árboles de sombra con síntomas de ojo de gallo. **A)** y **B)** *Erythrina* spp., **C)** *Eriobotrya japonica*, **D)** *Psidium guajava* y **E)** *Persea americana*.





**Figura 2.8.** Síntomas y signos de *Mycena citricolor* en *Erythrina poeppigiana* **A)** Lesiones. **B)** Geminíferos. **C)** Lesiones y caída de tejido muerto.



**Figura 2.9.** Apariencia del área del cafetal con árboles de sombra de poró infectados con *Mycena citricolor*. **A)** Defoliación severa. **B)** Detalle de las lesiones en poró. **C)** Hojas de cafeto caídas por daño de ojo de gallo.

**Cuadro 2.5. Especies de árboles registradas en 27 fincas con historial de ojo de gallo, porcentaje de uso como sombra y presencia de síntomas y signos de *Mycena citricolor*, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2011-2014.**

Especies	Nombre común	Familia	Porcentaje de uso <sup>a</sup>	Presencia de Síntomas/Signos
<i>Annona cherimola</i> Miller	Anona	Annonaceae	18	+/+
<i>Bursera simaruba</i> Sarg.	Indio desnudo	Burseraceae	4	-/-
<i>Cedrela</i> P.Browne	Cedro	Meliaceae	7	-/-
<i>Citrus</i> L.	Cítricos	Rutaceae	15	-/-
<i>Erythrina</i> L.	Poró	Leguminosae	96	+/+
<i>Eucalyptus</i> L'Hér.	Eucalipto	Myrtaceae	7	-/-
<i>Ficus</i> L.	Higuito	Moraceae	7	+/-
<i>Fraxinus</i> Tourn. ex L.	Fresno	Oleaceae	4	-/-
<i>Grevillea</i> R.Br.	Gravilea	Proteaceae	4	-/-
<i>Inga punctata</i> Willd.	Cuajiniquil	Leguminosae	7	-/-
<i>Mangifera indica</i> L.	Mango	Anacardiaceae	4	-/-
<i>Eriobotrya japonica</i> ( Thunb. ) Lindl.	Níspero	Rosaceae	4	+/+
<i>Musa</i> L.	Banano, Guineo	Musaceae	89	-/-
No identificado	No identificado	Leguminosae	4	+/+
<i>Persea americana</i> Mill.	Aguacate	Lauraceae	22	+/+
<i>Pinus</i> L.	Pino	Pinaceae	4	-/-
<i>Psidium friedrichsthalianum</i> Nied.	Cas	Myrtaceae	4	-/-
<i>Psidium guajava</i> L.	Guayaba	Myrtaceae	11	+/+
<i>Quercus</i> L.	Roble	Fagaceae	11	-/-
<i>Ricinus communis</i> L.	Higuerilla	Euphorbiaceae	7	+/+
<i>Salix</i> L.	Sauce	Salicaceae	4	-/-
<i>Senna papillosa</i> (Britton & Rose) H.S.Irwin & Barneby	Vainillo	Leguminosae	nd	+/+
<i>Spondias purpurea</i> L.	Jocote	Anacardiaceae	7	-/-
<i>Yucca guatemalensis</i> Baker	Itabo	Agavaceae	7	-/-

a: porcentaje de fincas que usan la especie como árbol de sombra.

Durante una prueba de campo en la época lluviosa del 2013, se halló un parche de la enfermedad caracterizado por la presencia de ojo de gallo en la sombra de poró, esta área presentó incidencia y severidad mayores al 90% (cuantificada visualmente) (Figura 2.9).

Con respecto al muestreo de arvenses, se encontró que 32 especies comunes en cafetales son hospederas de *M. citricolor*, de las cuales se logró identificar 27 especies (Cuadro 2.6, Figura 2.10). Además, se registraron dos *Phaseolus* silvestres y tres especies no fueron identificadas.

Las especies identificadas se ubican en 21 familias botánicas, siendo 3 las que presentan mayor cantidad de géneros susceptibles al hongo, Asteraceae (3), Commelinaceae (3) y Leguminosae (3).

Las familias Amaranthaceae y Solanaceae, tienen dos representantes cada uno. El resto de familias contienen solo una especie hospedera.

Se hallaron 3 géneros de helechos hospederos, pertenecientes a 3 familias distintas, Dryopteridaceae, Polypodiaceae y Dennstaedtiaceae.

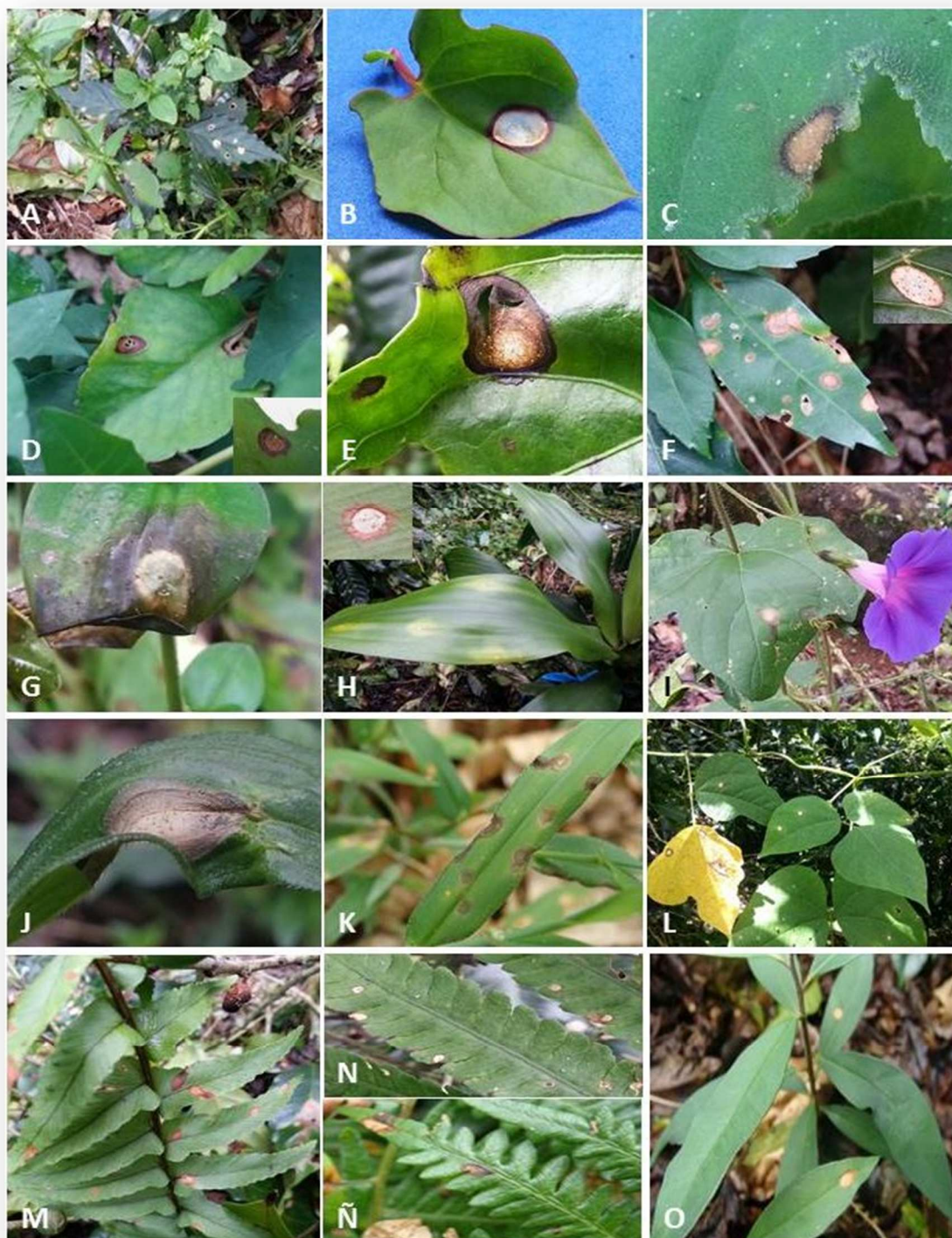
Las especies más comúnmente presentes en las fincas de estudio (cuantificación visual) fueron *A. cordifolia*, *C. erecta*, *C. diffusa*, *H. phyllostachya*, *I. nil*, *I. celosia*, *Polypodium* sp., *P. caudatum* y *S. assurgens*.

Por otra parte, *A. cordifolia*, *B. calycinum*, *C. verticillata* y *C. donnell-smithii* fueron las arvenses que con mayor frecuencia se encontraron con lesiones (cuantificación visual).

**Cuadro 2.6. Especie, nombre común y familia de arvenses con síntomas y signos de *Mycena citricolor* halladas en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2012-2014.**

Especie	Nombre común	Familia
<i>Amaranthus</i> L.	nd	Amaranthaceae
<i>Aneilema</i> R.Br	nd	Commelinaceae
<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis	Moquillo	Basellaceae
<i>Begonia</i> L.	Begonia	Begoniaceae
<i>Bryophyllum calycinum</i> Salisb.	Hoja de aire	Crassulaceae
<i>Cestrum nocturnum</i> L.	nd	Solanaceae
<i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C. E. Jarvis	Trepadora	Vitaceae
<i>Citharexylum donnell-smithii</i> Greenm.	Dama	Verbenaceae
<i>Commelina diffusa</i> Burm. f.	Ñerbillo	Commelinaceae
<i>Commelina erecta</i> L.	Ñerbillo	Commelinaceae
<i>Crassocephalum crepidioides</i> S. Moore	Clavelillo	Asteraceae
<i>Dracaena deremensis</i> Engl.	Caña india	Dracaenaceae
<i>Dryopteris filix-mas</i> (L.) Schott	Helecho	Dryopteridaceae
<i>Galinsoga quadriradiata</i> Ruiz & Pav.	Mielcilla	Asteraceae
<i>Hypoestes phyllostachya</i> Baker	Sarampión	Acanthaceae
<i>Ipomoea nil</i> Roth	Campanilla	Convolvulaceae
<i>Iresine celosia</i> L.	Zorrillo	Amaranthaceae
<i>Myrsine subsessilis</i> F.Muell.	Ratoncillo	Myrsinaceae
<i>Paspalum candidum</i> Kunth	Zacate de agua	Poaceae
<i>Phaseolus dumosus</i> Macfad.	Frijol Cubá	Leguminosae
<i>Polypodium</i> L.	Helecho	Polypodiaceae
<i>Pteridium caudatum</i> Maxon	Helecho macho	Dennstaedtiaceae
<i>Rubus adenothyrus</i> Cardot	Mora silvestre /Zarzamora	Rosaceae
<i>Solanum betaceum</i> Cav.	Tomate de palo	Solanaceae
<i>Spananthe paniculata</i> Jacq	Carricillo	Apiaceae
<i>Spermacoce assurgens</i> Ruiz & Pav.	Chiquizacillo	Rubiaceae
<i>Verbesina turbacensis</i> Kunth	Tora blanca	Asteraceae





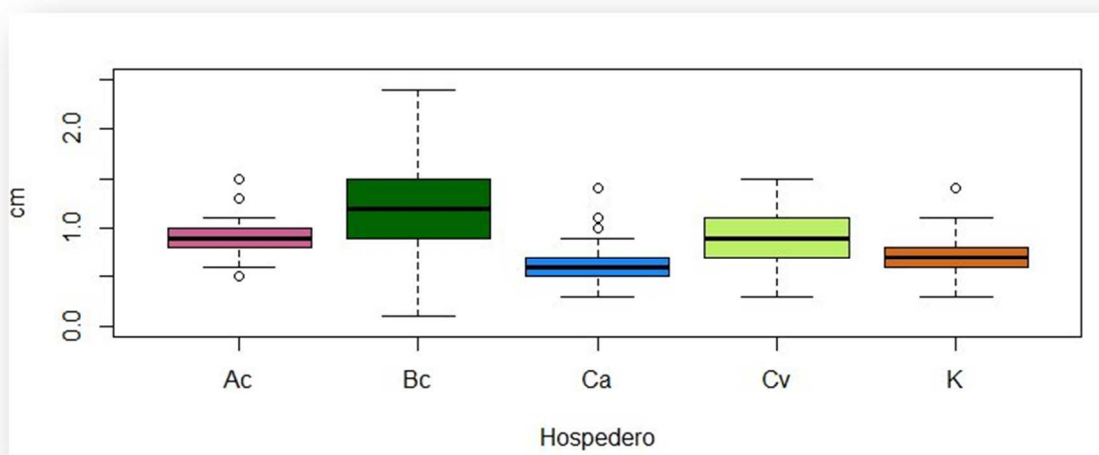
**Figura 2.10.** Arvenses hospederas de *M. citricolor*. **A)** *Amaranthus* L., **B)** *A. cordifolia* (Ten.) Steenis, **C)** *Begonia* L., **D)** *B. calycinum* Salisb., **E)** *C. verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis, **F)** *C. donnell-smithii* Greenm., **G)** *Commelina* L., **H)** *D. deremensis* Engl., **I)** *I. nil* Roth, **J)** *S. assurgens* Ruiz & Pav., **K)** *P. candidum* Kunth, **L)** *P. dumosus* Macfad., **M)** y **N)** *Polypodium* L., **Ñ)** *P. caudatum* Maxon, **O)** *M. subsessilis* F. Muell.



## ii. Caracterización de lesiones

Las lesiones en arvenses y cafeto descritas de las fincas CAT y CO presentaron coloración beige-café. Las de Caturra y Catimor-CR95 no presentaron anillo<sup>10</sup>, su forma fue circular si se encontraban en la lámina foliar, o alargada si estaban en la venación.

El diámetro total de las lesiones (Figura 2.11) difiere significativamente entre los hospederos ( $p < 2 \times 10^{-16}$ ). Siendo que la mayor diferencia la presentan los hospederos Ca con Bc y K con Bc, ambas relaciones con probabilidad nula de ser iguales ( $p = 0,0000000$ ), de acuerdo a la prueba de Tukey; seguidas de la diferencia entre Bc con Cv ( $p = 0,0000018$ ) y Bc con Ac ( $p = 0,0000161$ ), luego los hospederos Ca y Ac ( $p = 0,0000573$ ). Finalmente, para K y Ac la probabilidad de producir lesiones de igual tamaño es de 0,0042610.

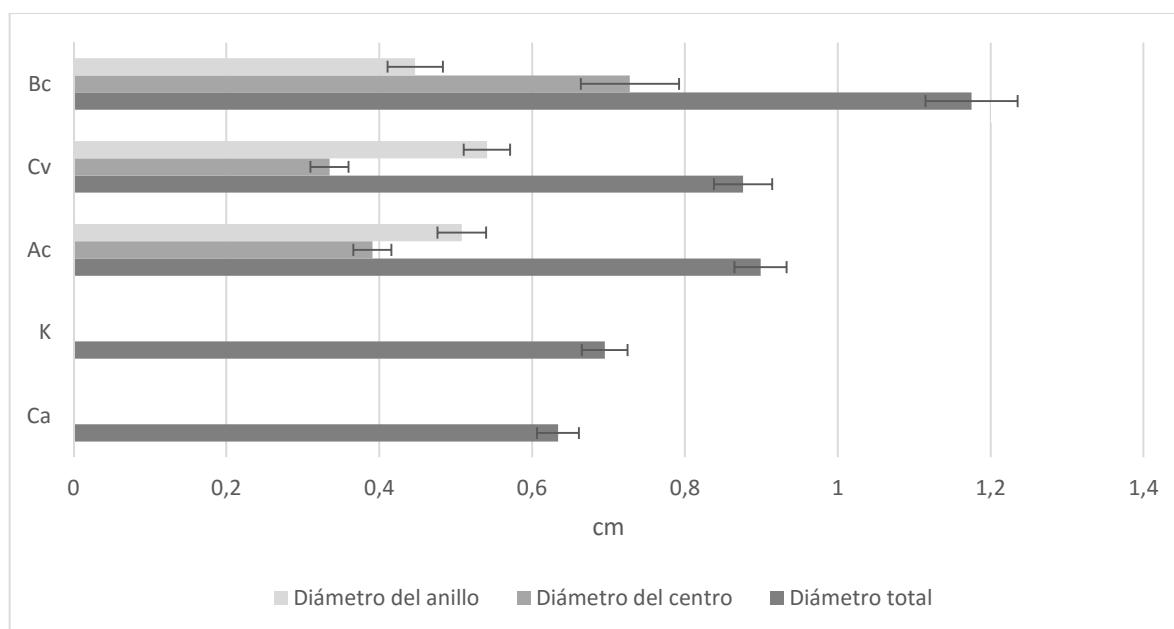


**Figura 2.11.** Diámetro total (cm) de 250 lesiones presentes en 5 hospederos de *M. citricolor*, colectadas en las fincas CAT y CO, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

Las lesiones presentes en las arvenses *A. cordifolia*, *B. calycinum* y *C. verticillata* presentaron anillo de aproximadamente 0,5 cm de ancho y de coloración rojiza, café o necrótico con zona de avance traslúcida, respectivamente (Figura 2.12).

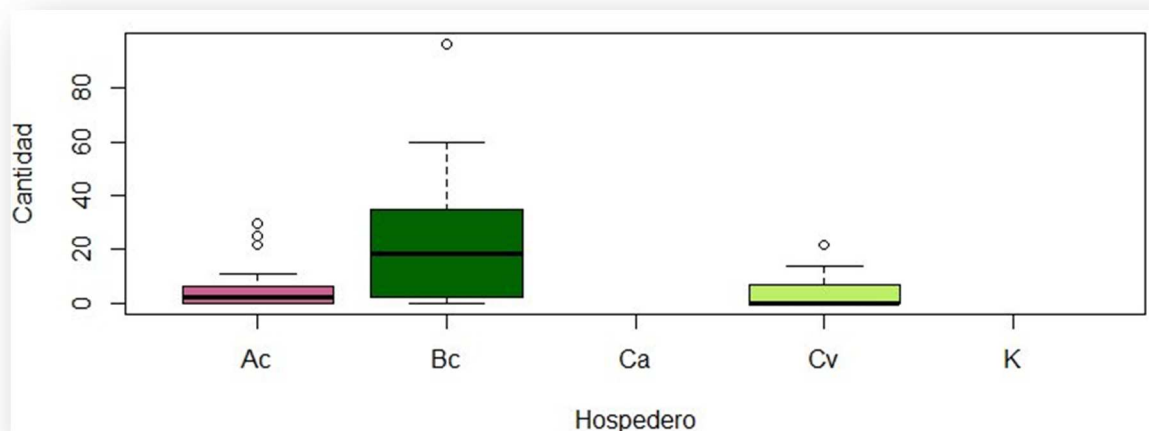
<sup>10</sup> El término anillo se refiere a un área de distinta coloración que rodea el margen de la lesión en algunos hospedantes.

Se observó zonación en la mayoría de las lesiones producidas en *B. calycinum* y en algunas de las presentes en cafeto.

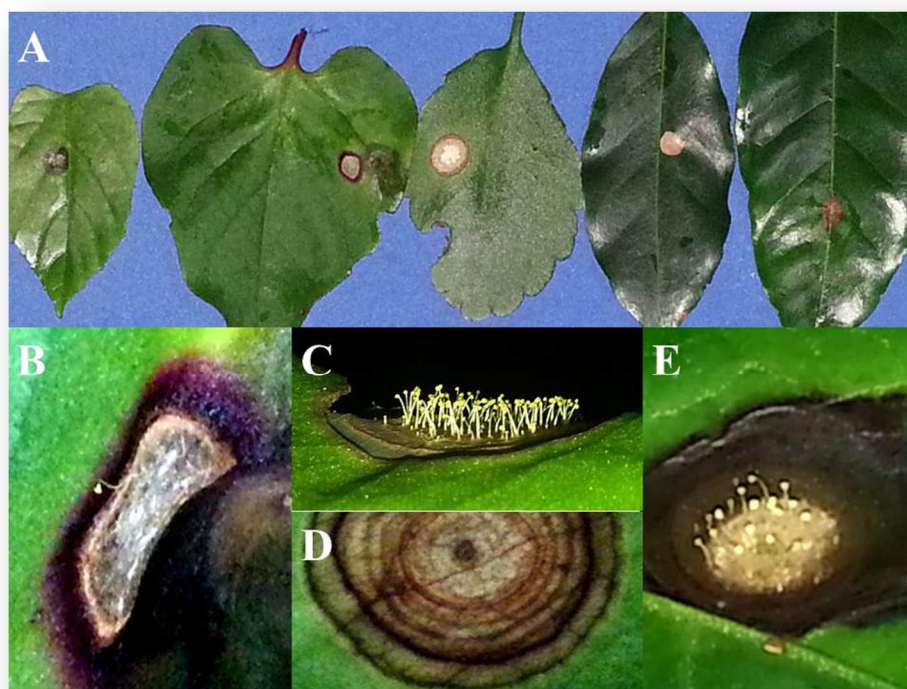


**Figura 2.12.** Promedios (cm) del diámetro total y del centro y ancho del anillo de 250 lesiones presentes en 5 hospederos de *M. citricolor*, colectadas en las fincas CAT y CO, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

Se contabilizaron 5,0, 22,5 y 10,5 geminíferos por lesión para *A. cordifolia*, *B. calycinum* y *C. verticillata*, respectivamente. No se registraron estructuras en las lesiones provenientes de cafeto (Ca y K)(Figura 2.13 y Figura 2.14).



**Figura 2.13.** Cantidad de geminíferos registrados en 250 lesiones presentes en 5 hospederos de *M. citricolor*, colectadas en las fincas CAT y CO, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.



**Figura 2.14.** Lesiones producidas por *M. citricolor*. **A)** De izquierda a derecha *C. verticillata* (Cv), *A. cordifolia* (Ac), *B. calycinum* (Bc), cafeto variedad Caturra (Ca) y cafeto variedad CR95 (Catimor) (K). **B)** Detalle de lesión y geminífero en *A. cordifolia*. **C)** y **D)** Detalle de lesión presente en *B. calycinum*, **C)** Geminíferos y **D)** Zonación. **E)** Detalle de lesión y geminíferos en *C. verticillata*.

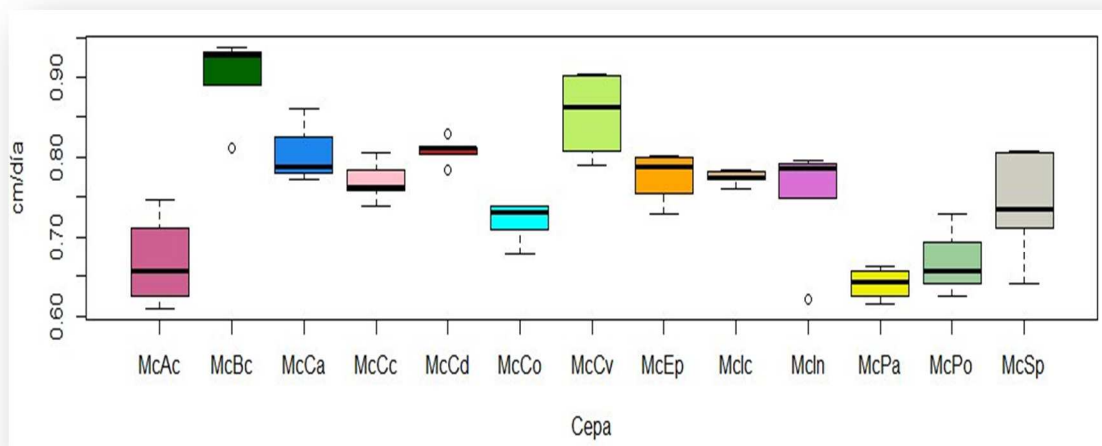
### iii. Aislamiento y caracterización de aislamientos

Los aislamientos recuperados (cepas del patógeno) se nombraron de acuerdo al hospedero (fuente de inóculo) del cual fueron recuperados (Cuadro 2.7).

El aislamiento recuperado de aguacate (McPa) presentó la menor velocidad de crecimiento en medio de cultivo, 0,64 cm/día; mientras que la cepa aislada de hoja de aire (McBc) fue la más rápida en cubrir el plato Petri, con una velocidad de 0,90 cm/día. El aislamiento a partir de cafeto (McCa), usado como patrón de comparación, mostró una velocidad de 0,77 cm/día (Figura 2.15).

**Cuadro 2.7.** Código, fuente de inóculo y procedencia de las cepas de *M. citricolor* recuperadas de cultivo, árboles de sombra y arvenses presentes en las fincas de estudio, en la Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

Nombre	Fuente de inóculo	Procedencia
McAc	<i>A. cordifolia</i>	CAT
McBc	<i>B. calycinum</i>	CO
McCa	<i>C. arabica</i> var. Caturra	CAT
McCc	<i>C. crepidioides</i>	CAT
McCd	<i>C. donnell-smithii</i>	CAT
McCv	<i>C. verticillata</i>	CAT
McCo	<i>Commelina</i> sp	G7
McEp	<i>E. poeppigiana</i>	CAT
McIr	<i>I. celosia</i>	CAT
McIn	<i>I. nil</i>	CAT
McPa	<i>P. americana</i>	CAT
McPo	<i>Polypodium</i> sp.	CAT
McSp	<i>S. papillosa</i>	CAT



**Figura 2.15.** Velocidad de crecimiento (cm/día) en medio de cultivo (PDA+Lev) de 13 cepas de *M. citricolor* recuperadas de cultivo, árboles de sombra y arvenses presentes en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

De acuerdo al análisis de varianza estos resultados son significativamente diferentes,  $p = 2,5 \times 10^{-10}$  con  $\alpha=0,05$ , las mayores diferencias entre las velocidades de crecimiento las registran las cepas McBc con McPa, McPo y McAc, todas las relaciones con probabilidades nulas de similitud, de acuerdo a la prueba Tukey ( $\alpha=0,05$ ). La cepa McBc difiere también con las cepas McCo ( $p=0,0000082$ ), McSp ( $p=0,0000954$ ), McIn ( $p=0,0002500$ ), McCc ( $p=0,0028576$ ), McEp ( $p=0,0043549$ ), finalmente de la cepa McIc ( $p=0,0045504$ ).

Las cepa McAc es diferente a la cepa McCv ( $p=0,0000369$ ), de la cepa McCd ( $p=0,00119674$ ), de McCa ( $p=0,0117157$ ), de la McIc ( $p=0,0477010$ ) y por último de la cepa McEp con una probabilidad de 0,0493957.

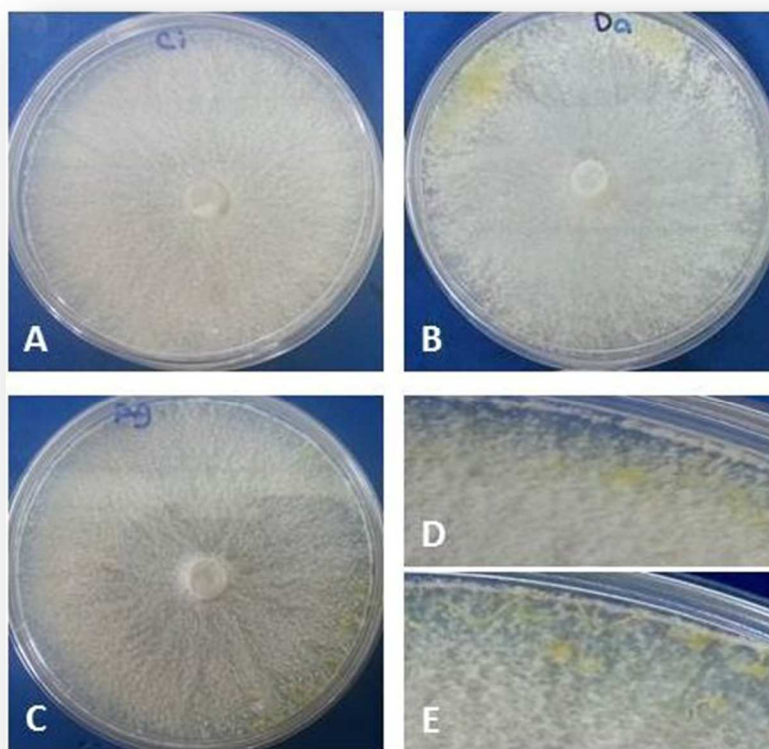
La cepa McCa difiere de las cepas McPa y McPo,  $p=0,0005215$  y  $p=0,0303479$ , respectivamente. Finalmente, la cepa McPa difiere de la cepa McCc ( $p=0,0026421$ ).

A los 8 días de crecimiento, ninguna de las cepas de *M. citricolor* produjo geminíferos. A los 15 días de exposición a la luz y 22 días de crecimiento, sólo las cepas provenientes de *C. donnell-smithii* (McCd) y de *I. celosía* (McIr) habían producido geminíferos, 9,74 y 2,86% de área, respectivamente. Uno de los platos de la cepa proveniente de aguacate (McPa) produjo basidiocarpos, los que representaron el 1,78% del área del plato (Figura 2.16).

A los 8 días de crecimiento *in vitro* las cepas McBc, McCd, McCo, McCv y McIn presentaron micelio más compacto y blanco. McCv y McIn presentaban hebras de micelio y McCd presentó pequeñas motas en la parte central de la colonia (Figura 2.17).

A los 30 días de exposición a la luz las cepas McIr y McPa presentaron un micelio muy compacto y blanco, junto con los valores de densidad más altos. La cepa McIr presentaba motas grandes en el margen de la colonia.

Luego de la colocación de los discos de follaje todas las cepas produjeron geminíferos sobre tejido vegetal, no así a partir del micelio.



**Figura 2.16.** Micelio, geminíferos y basidiocarpos producidos por 3 cepas de *M. citricolor* con 15 días de exposición a la luz. **A)** McCv sin estructuras, **B)** McCd con presencia de geminíferos, **C)** McPa con presencia de basidiocarpos, **D)** Detalle de área con geminíferos, **E)** Detalle de área con basidiocarpos.

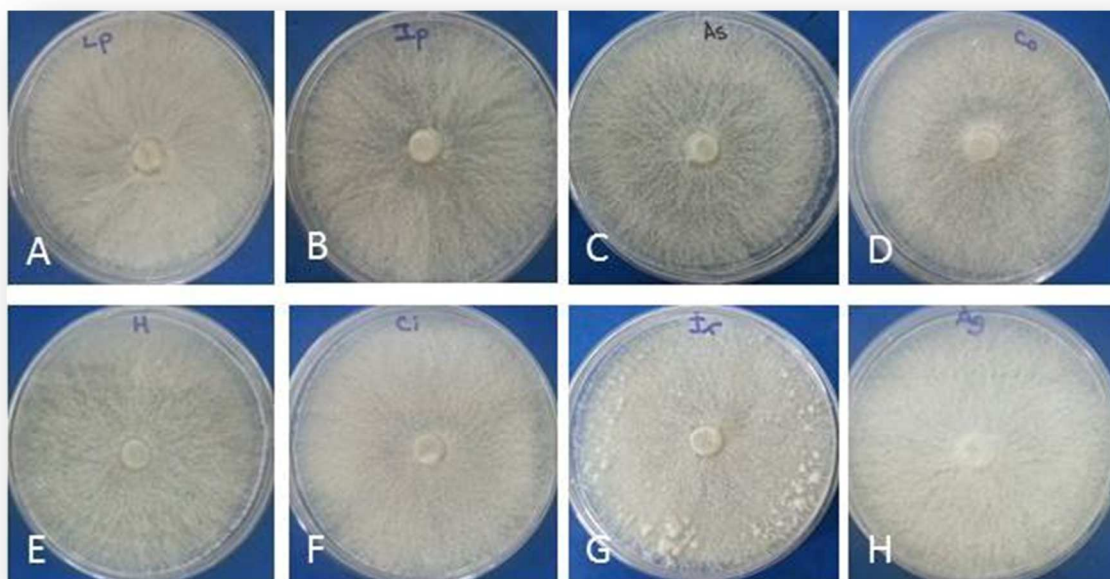
Las cepas restantes formaron micelio ralo de coloración beige, excepto McCv que presentó micelio un poco más compacto y blanco. Las cepas McEp y McCc formaron pequeñas motas de micelio. La cepa McSp fue la que registró el menor valor de densidad de micelio (Cuadro 2.8, Figura 2.18). Los resultados se mantuvieron iguales para la evaluación a los 30 y 45 días de edad de los cultivos.

Las cepas que produjeron mayor cantidad de geminíferos fueron la proveniente de cultivo (McCa) con 280,3 geminíferos promedio en las 4 repeticiones, las cepas McCd y McCv con 277,8 y 276,0 respectivamente; mientras que la cepa que produjo la menor cantidad fue la recuperada a partir de poró (McEp), 28,0 en promedio (Cuadro 2.9, Figura 2.19).

**Cuadro 2.8.** Densidad (píxeles) y descripción del micelio de 10 cepas de *M. citricolor* con 30 días de exposición a la luz, colectadas a partir de arvenses y árboles de sombra en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

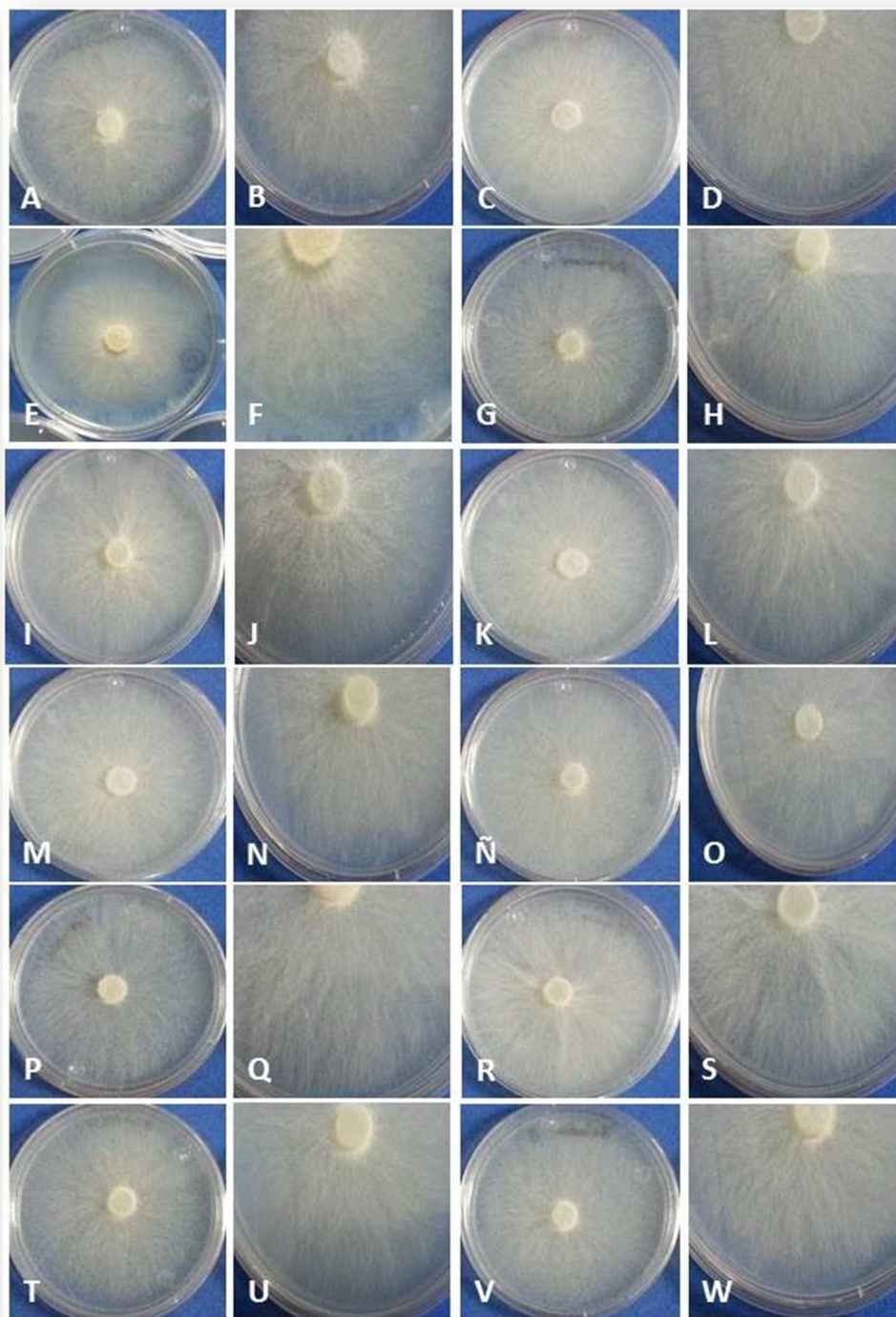
Cepa	Densidad de micelio	Descripción de micelio
McSp	88990375	ralo, beige
McBc	96215661	ralo, beige
McIn	104453946	ralo, beige
McEp	190263782	ralo, beige, motas pequeñas
McCc	241447919	ralo, beige, motas pequeñas
McCo	248173054	ralo, beige-blanco
McPo	260069434	ralo, beige
McCv	285006456	ralo-espeso, blanco
McIr	315809057	espeso, muy blanco, motas grandes
McPa	569990486	espeso, muy blanco

La producción de propágulos a partir de micelio fue muy pobre, el valor más alto registrado fue 15,51% de área para la cepa proveniente del árbol de dama (McCd).

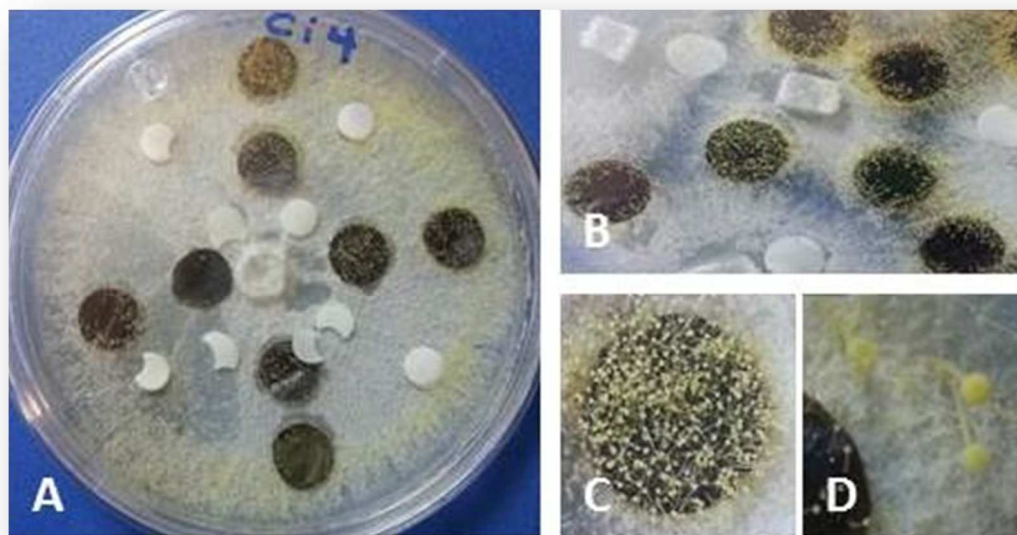


**Figura 2.17.** Densidad de micelio de 8 cepas de *M. citricolor* con 30 días de exposición a la luz. **A)** McSp **B)** McIn **C)** McCc **D)** McCo **E)** McPo **F)** McCv **G)** McIr **H)** McPa. Ordenados ascendentemente de acuerdo al valor de densidad en pixeles.





**Figura 2.18.** Micelio de 12 cepas de *M. citricolor* con 8 días de crecimiento a la oscuridad en en medio de cultivo (PDA+Lev), recuperado de: **A)** y **B)** McAc **C)** y **D)** McBc, **E)** y **F)** McCa **G)** y **H)** McCc, **I)** y **J)** McCd **K)** y **L)** McCv, **M)** y **N)** McCo, **Ñ)** y **O)** McEp, **P)** y **Q)** McIr, **R)** y **S)** McIn, **T)** y **U)** McPa, **V)** y **W)** McPo .



**Figura 2.19.** Geminíferos y basidiocarpos producidos por 3 cepas de *M. citricolor* luego de 8 días de colocación de los discos de follaje. **A)** McCv **B)** y **C)** Detalle de estructuras producidas sobre discos y micelio de McCa **D)** Detalle de basidiocarpos producidos por McCc.

**Cuadro 2.9.** Presencia, cantidad y porcentaje de área con geminíferos desarrollados sobre discos de follaje de café o micelio, luego de 8 días de colocación de los discos de follaje, de 12 cepas de *M. citricolor* colectadas a partir de cafeto en producción, arvenses y árboles de sombra, en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

Cepa	Geminíferos			
	Discos		Micelio	
	Presencia/repetición	Cantidad promedio	Presencia/repetición	% de área promedio
McEp	+/+/-	28,0±7,6	-/-/-	0,00±0,00
McIn	+/+/+	43,3±3,5	-/-/-	0,00±0,00
McAc	+/+/+	77,3±29,5	+/-/-	0,66±0,38
McPo	+/+/-nd	81,3±37,5	-/-/+nd	0,30±0,30
McPa	+/+/+	90,3±33,2	-/-/-	0,00±0,00
McSp	+/+/+	106,0±38,2	-/-/-	0,00±0,00
McIr	+/+/+	115,3±30,0	+/+/+	7,86±2,30
McBc	+/+/+	148,5±22,0	-/-/+	1,57±1,57
McCo	+/+/+	158,8±46,9	-/-/-	0,00±0,00
McCc	+/+/+	172,3±65,7	-/-/+	3,21±3,21
McCv	+/+/+	276,0±62,5	-/-/+	4,45±4,45
McCd	+/+/+	277,8±17,3	+/+/+	15,51±3,80
McCa	+/+/+	280,3±39,3	+/-/-	0,23±0,23

+ : presencia - : ausencia nd : no dato

### 3. Determinación de la patogenicidad del inóculo

#### i. Bioensayo 1. Gemas directas de campo

Con respecto al éxito de infección logrado por las cepas inoculadas, la proveniente de cafeto variedad CR95 (McK) mostró el éxito de infección máximo, aunque no presenta diferencia estadísticamente significativa con las cepas McCa (93,3%) y McVol (88,9%), también procedentes de cafeto. Sin embargo, se detectó diferencia en la cantidad de gemas no viables, siendo que todas las gemas procedentes de McK y McVol eran viables, mientras que casi el 7% de las gemas McCa no germinaron.

En general, las cepas que lograron menor porcentaje de éxito de infección a su vez tenían mayor cantidad de gemas no viables, lo que se describe con el coeficiente de correlación entre estas variables,  $r = -0,97$ .

**Cuadro 2.10.** Porcentaje de éxito de infección de 7 cepas de *M. citricolor* provenientes de campo, colectado en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

Cepa	Éxito de infección Total*	Gemas No Viables <sup>11</sup>	Éxito de infección/colocación	
			bien	mal
McCv	30,0 <sup>a</sup>	64,0 <sup>d,e,f</sup>	36,0	0,0
McBc	50,0 <sup>a,b</sup>	29,4 <sup>d,e,f</sup>	70,6	16,7
McAc	65,0 <sup>a,b,c</sup>	18,8 <sup>d,e</sup>	81,3	0,0
McSp	72,7 <sup>b,c</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	100,0	45,5
McVol	88,9 <sup>b,c</sup>	0,0 <sup>a,b,c</sup>	100,0	0,0
McCa	93,3 <sup>b,c</sup>	6,7 <sup>d</sup>	93,3	na
McK	100,0 <sup>c</sup>	0,0 <sup>a</sup>	100,0	100,0

na: no aplica. \*: Diferencias entre proporciones seguidas de una misma letra no se consideran distintas según la prueba de Marascuillo ( $\alpha = 0,05$ ).

La cepa McK fue la primera en producir lesiones, a los dos días después de la inoculación (ddi). El resto de las cepas iniciaron con la producción de lesiones a los 4 ddi.

<sup>11</sup> El término gemas no viables se refiere a las gemas que fueron bien colocadas pero que no produjeron lesión.

Cuatro de las siete cepas evaluadas produjeron el 100% de las lesiones a los 6 ddi. La cepa McSp produjo el total de lesiones a los 8 días, McCv a los 10 días y la cepa McBc se estabilizó a los 14 días.

**Cuadro 2.11.** Diámetro y tiempo de aparición de lesiones desarrolladas en follaje de cafeto var. Caturra inoculado con gemas de campo provenientes de 7 cepas de *M. citricolor*, colectadas en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

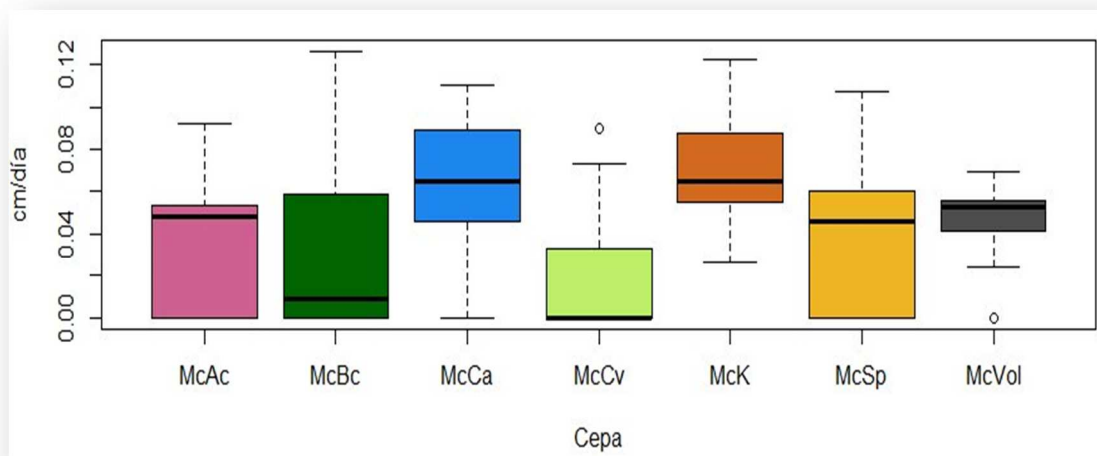
Cepa	Diámetro de lesión (cm)			Tiempo (días)	
	Inicial	Promedio	Máximo	Aparición de lesión	Máximo desarrollo de lesión
McCa	0,23±0,04	0,77±0,07	0,90	4	18
McK	0,02±0,01	1,04±0,07	1,27	2	26
McCv	0,06±0,02	1,03±0,12	1,28	4	20
McSp	0,16±0,03	0,96±0,12	1,33	4	20
McBc	0,10±0,03	1,18±0,13	1,48	4	20
McAc	0,27±0,09	0,99±0,16	1,62	4	18
McVol	0,18±0,04	0,90±0,19	1,76	4	18

El mayor diámetro de lesión (1,76 cm) fue producido por la cepa de cafeto voluntario a los 18 días y el menor diámetro (0,90 cm) por cafeto Caturra en la misma fecha (Cuadro 2.11).

Alrededor del 50% de lesiones producidas por la cepas McAc y McK coalescieron a partir del día 12.

Las cepas presentaron diferencia estadística con respecto a la velocidad de desarrollo de las lesiones ( $p=7,97 \times 10^{-10}$ ,  $\alpha=0,05$ ) (Figura 2.20).

De acuerdo a la prueba de CHI CUADRADO el éxito de infección según la colocación depende de la cepa de la cual proviene el propágulo ( $X^2=0,0153857$  con  $\alpha=0,05$ ).



**Figura 2.20.** Velocidad de crecimiento (cm/día) de las lesiones desarrolladas en follaje de cafeto var. Caturra inoculado con gemas de 7 cepas de *M. citricolor* provenientes de campo, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

De acuerdo a la prueba de Tukey HSD existe diferencia entre las velocidades de crecimiento promedio de la cepa McK con las cepas McCv ( $p=0,00000$ ), McBc ( $p=0,0000241$ ), McAc ( $p=0,0009224$ ) y con McSp ( $p=0,0166488$ ).

También presentan diferencias la cepa McCa con McCv ( $p=0,0001403$ ) y McBc ( $p=0,0384396$ ).

Con respecto a la producción de geminíferos, la cepa proveniente de hoja de aire (McBc) produjo considerablemente más geminíferos que las otras, 306 propágulos; mientras que la cepa recuperada del árbol de sombra *S. pillosa* (McSp) no produjo estructuras (Cuadro 2.12).

La cantidad máxima de geminíferos para las cepas provenientes de ambas variedades de café se registró a los 26 ddi.

La cepa proveniente de café Catimor (McK) inició la producción de geminíferos 6 días antes y produjo casi el doble de propágulos que la recuperada de Caturra (McCa), 77 versus 44.

Las cepas McCv y McBc produjeron propágulos desde los 14 y 12 hasta los 30 ddi, respectivamente.

**Cuadro 2.12.** Cantidad máxima de geminíferos desarrollados, tiempo de aparición de los primordios y tiempo a máxima cantidad de geminíferos originados por las lesiones producidas en follaje de cafeto var. Caturra inoculado con gemas de campo provenientes de 7 cepas de *M. citricolor*, procedentes de las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

Cepa	Máxima cantidad geminíferos	Tiempo (días)	
		Aparición primordios	Máxima cantidad
McVol	23	16	18*
McCv	35	14	30
McCa	44	18	26
McAc	54	12	18*
McK	77	12	26
McBc	306	12	30
McSp	-	na	na

\*: se evaluó hasta los 18 ddi.

## ii. Bioensayo 2. Gemas producidas en laboratorio

Las cepas que presentaron los mayores éxitos de infección fueron las provenientes de cafeto variedad Caturra (McCa) y de la arvense trepadora *C. verticillata* (McCv), con 60,00 y 56,67 %, respectivamente.

Los aislamientos provenientes de dama (McCd) y poró (McEp) fueron los que produjeron menor infección, ambos con 6,67% (Cuadro 2.13).

Esta última cepa fue la que mostró la mayor cantidad de gemas no viables, 93,10%; en contraste con McCa que registró el 40,00%, valores que presentan diferencia estadísticamente significativa (Cuadro 2.13).

En general, las cepas que lograron menor porcentaje de éxito de infección a su vez tenían mayor cantidad de gemas no viables, lo que se describe con el coeficiente de correlación entre estas variables,  $r = -0,97$ .

De acuerdo a la prueba de CHI CUADRADO el éxito de infección según la colocación depende de la cepa de la cual proviene el propágulo ( $X^2 = 2,64402 \times 10^{-9}$  con  $\alpha = 0,05$ ).

Así, 7 de las cepas no fueron capaces de provocar infección si la gema fue mal colocada, mientras que 3 sí lo lograron en más del 50%, siendo que la cepa proveniente de la arvense

*C. crepidioides* (McCc) logró el 100% de infección de las gemas mal colocadas (Cuadro 2.13).

**Cuadro 2.13.** Porcentaje de éxito de infección del inóculo tomado de 13 fuentes de inóculo de *M. citricolor* provenientes de cultivo *in vitro*, colectado en las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

Cepa	Éxito de infección Total*	Gemas No Viables*	Éxito de infección/colocación	
			bien	mal
McCd	6,67 <sup>a</sup>	90,45 <sup>b,c</sup>	9,52	0,00
McEp	6,67 <sup>a</sup>	93,10 <sup>c</sup>	6,90	0,00
McPa	13,33 <sup>a,b,c</sup>	84,00 <sup>a,b,c</sup>	16,00	0,00
McIn	16,67 <sup>a,b,c</sup>	82,14 <sup>a,b,c</sup>	17,86	0,00
McSp	16,67 <sup>a,b,c</sup>	78,26 <sup>a,b,c</sup>	21,74	0,00
McIc	18,51 <sup>a,b,c</sup>	84,00 <sup>a,b,c</sup>	16,00	50,00
McCc	23,33 <sup>a,b,c</sup>	82,14 <sup>a,b,c</sup>	17,86	100,00
McCo	23,33 <sup>a,b,c</sup>	88,00 <sup>a,b,c</sup>	12,00	80,00
McPo	30,00 <sup>a,b,c</sup>	65,38 <sup>a,b,c</sup>	34,62	0,00
McBc	50,00 <sup>a,b,c</sup>	46,43 <sup>a,b,c</sup>	53,57	0,00
McAc	53,33 <sup>a,b,c</sup>	46,67 <sup>a,b,c</sup>	53,33	na
McCv	56,67 <sup>c</sup>	41,38 <sup>a,b</sup>	58,62	0,00
McCa	60,00 <sup>c</sup>	40,00 <sup>a</sup>	60,00	na

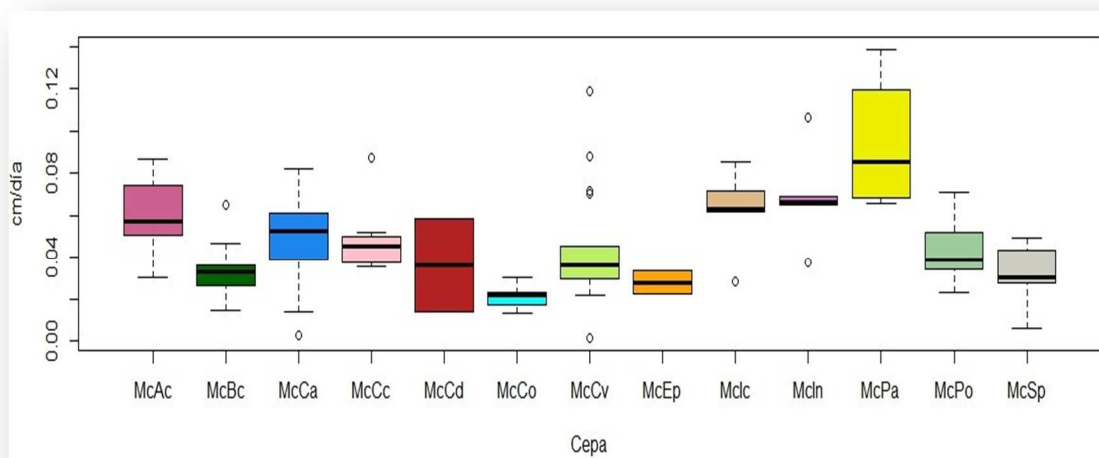
na: no aplica. \*: Diferencias entre proporciones seguidas de una misma letra no se consideran distintas según la prueba de Marascuillo ( $\alpha = 0,05$ ).

Seis de las 13 cepas evaluadas produjeron sus primeras lesiones a los 4 ddi, la primera cepa en producir lesiones fue McIc a los 2 ddi; mientras que el aislamiento McEp fue el último en producir lesiones, a los 12 días.

El mayor diámetro de lesión fue producido por la cepa proveniente de aguacate (McPa) que registró 2,538cm, seguida por los aislamientos de las arvenses *I.nil* (McIn) y *I.celocia* (McIc) con 1,935cm y 1,805cm, respectivamente. Por otro lado las cepas que registraron los menores valores fueron la cepa recuperada de *Commelina* sp. (McCo) y del árbol de sombra *S. papillosa* (McSp), con 0,47 cm y 0,77 cm, respectivamente (Cuadro 2.14).

El 100% de lesiones producidas por la cepas McPa y McIn coalescieron a partir del día 16.

Las cepas difieren estadísticamente ( $\alpha=0,05$ ) en cuanto a la velocidad de crecimiento de las lesiones que producen ( $p=5,24 \times 10^{-7}$ ) (Figura 2.21).



**Figura 2.21.** Velocidad de crecimiento (cm/día) de las lesiones desarrolladas en follaje de cafeto var. Caturra, inoculado con gemas producidas en laboratorio, de 13 cepas de *M. citricolor*, provenientes de las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

Según la prueba de Tukey HSD, las cepas que presentan la mayor diferencia son McPa y McCo con  $p \text{ adj}=0,0000051$ . Seguidas por la relación entre McPa con McBc ( $p=0,0000264$ ), McPa y McSp ( $p=0,0006398$ ). La cepa proveniente del aguacate también difiere de la cepa McCv ( $p=0,0016927$ ), de la cepa McPo ( $p=0,0029764$ ), de la cepa de cafeto ( $p=0,0054806$ ), de la de poró ( $p=0,0136535$ ) y de la McCc ( $p=0,0284200$ ).

Por otro lado, la cepa McAc difiere de la cepa McBc ( $p=0,0081647$ ) y de la McCo ( $p=0,00115412$ ). La última es diferente a las cepas McIn ( $p=0,0052815$ ) y a la cepa McIc ( $p=0,0342902$ ).

Las cepas McPa y McCo fueron las que tardaron menos tiempo en alcanzar el máximo desarrollo de las lesiones, 18 ddi; mientras que las cepas McBc y McIc lograron el máximo desarrollo hasta los 28 ddi.

Por otro lado, las cepas McPa, McCc, McCv y McCa lograron el máximo de infección en 8 ddi; mientras que el período más largo para alcanzar el máximo de infección lo registraron las cepas provenientes de poró y vainillo, a los 14 ddi.



**Cuadro 2.14.** Diámetro y tiempo de aparición de lesiones desarrolladas en follaje de cafeto var. Caturra inoculado con gemas de 13 cepas de *M. citricolor*, provenientes de las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

Cepa	Diámetro de lesión (cm)			Tiempo (días)	
	Inicial	Promedio	Máximo	Aparición de lesión	Máximo desarrollo de lesión
McCo	0,02±0,02	0,71±0,31	1,28	6	18
McSp	0,03±0,03	0,54±0,13	0,77	4	22
McBc	0,01±0,01	0,61±0,10	1,02	6	28
McEp	0,28±0,26	0,59±0,35	1,08	12	22
McCd	0,07±0,07	0,70±0,31	1,13	8	22
McPo	0,13±0,05	0,77±0,15	1,20	6	22
McCc	0,02±0,02	0,84±0,17	1,21	4	20
McCa	0,04±0,02	0,83±0,10	1,27	4	26
McCv	0,01±0,00	0,74±0,09	1,29	4	26
McAc	0,01±0,00	1,09±0,15	1,64	4	20
McIc	0,26±0,17	1,11±0,29	1,81	6	28
McIn	0,20±0,09	1,26±0,35	1,94	6	20
McPa	0,09±0,05	1,57±0,45	2,54	4	18

Con respecto a la producción de geminíferos la cepa McIc fue la que produjo la mayor cantidad, 54 en total; siete de las cepas produjeron menos de 10 y las cepas McCa y McSp no produjeron estructuras (Cuadro 2.15).

El tiempo de aparición de los primordios de geminíferos varió entre 12 ddi en McPa y 24 para McBc (Cuadro 2.15).

Con relación al IP, no fue posible calcular el valor de McCa\_L y McSp\_C y McSp\_L debido a que no produjeron gemas. La cepa McCa\_C presenta un valor bajo con respecto a las cepas recuperadas de CR95, *A. cordifolia* y *B. calycinum* (Cuadro 2.16).

**Cuadro 2.15.** Cantidad máxima de geminíferos desarrollados, tiempo de aparición de los primordios y tiempo a máxima cantidad de geminíferos originados por las lesiones producidas en follaje de cafeto var. Caturra inoculado con gemas producidas en laboratorio, de 13 fuentes de *M. citricolor*, provenientes de las fincas de estudio, Zona de Los Santos, Costa Rica, 2014.

Cepa	Máxima cantidad geminíferos	Tiempo (días)	
		Aparición primordios	Máxima cantidad
McAc	1	16	18
McPo	1	18	20
McCv	1	20	22
McEp	2	20	22
McBc	5	24	28
McCc	6	18	20
McPa	7	12	16
McCd	11	18	20
McIn	12	20	22
McCo	29	18	22
McIc	54	18	26
McCa	-	-	-
McSp	-	-	-

**Cuadro 2.16.** Índice y nivel de patogenicidad para 17 de las 20 cepas de *M. citricolor* estudiadas.

Cepa	IP	Nivel de patogenicidad*
McEp_L**	0,00	Bajo
McPo_L	0,01	Bajo
McCd_L	0,02	Bajo
McCv_L	0,03	Bajo
McAc_L	0,05	Bajo
McBc_L	0,06	Bajo
McCc_L	0,08	Bajo
McIn_L	0,11	Bajo
McCo_L	0,14	Bajo
McPa_L	0,16	Bajo
McIc_L	1,86	Bajo
McCv_C**	2,67	Bajo
McCa_C	3,67	Bajo
McVol_C	7,03	Medio
McAc_C	9,11	Medio
McK_C	9,94	Medio
McBc_C	18,87	Alto

\*: para determinar el nivel de patogenicidad se construyeron tres categorías, bajo, intermedio y alto, de acuerdo a los niveles mínimo y máximo del IP, así el nivel bajo lo constituyen los aislamientos con IP desde 0 hasta 6,29, el nivel medio va desde 0,6291 hasta 12,58 y el nivel alto los valores entre 12,59 hasta 18,87.

\*\* L: Laboratorio, C: Campo

## Discusión

La incidencia de la enfermedad y el nivel de inóculo residual, aunque bajos en la mayoría de las áreas durante el período del estudio, garantizaron la presencia de la enfermedad en las zonas de muestreo. La composición del piso del cafetal mostró que hay un alto componente de hojarasca en las fincas, aunque cambió de un año al siguiente revelando la variabilidad del sistema de producción del cafeto y la dinámica de la vegetación acompañante.

De acuerdo a los resultados, *M. citricolor* no se encuentra sobreviviendo en la hojarasca ni en el suelo, ya que no fue posible recuperarlo de estos sustratos por ninguna de las técnicas usadas, lo que confirma lo apuntado por Luttrell (1974) y Rayner *et al.* (1985) de que este hongo se comporta más como un organismo hemibiótrofo o necrótrofo típico que como un saprófito. Además, al no haber obtenido síntomas de la enfermedad en las plantas sembradas con sustrato y suelo tomado de áreas enfermas, no fue posible comprobar la hipótesis de que la hojarasca o el suelo funcionan como sustratos para sobrevivencia o fuentes de inóculo primario.

A inicios de la época lluviosa de 2013 (julio), los valores calculados para tres fincas indican que de la cantidad de lesiones totales contabilizada el mayor porcentaje en todas ellas fue de lesiones viejas y que la finca con mayor porcentaje fue CO con 77%. De acuerdo a lo que tradicionalmente se ha denominado inóculo residual y que se ha considerado igual al inóculo primario, se esperaría que esta finca tuviera la mayor cantidad de lesiones nuevas, producto del inóculo presente. Sin embargo, según los datos del Cuadro 2.4, se nota que la finca CO es la que tuvo menor porcentaje de lesiones nuevas.

De igual manera, la finca CAT que es la que muestra el mayor porcentaje de lesiones viejas con geminíferos y el mayor porcentaje de geminíferos por lesión, se esperaría mayor cantidad de lesiones nuevas; sin embargo, es la finca G11, que a pesar de tener el menor porcentaje de lesiones viejas (52%), presenta el mayor porcentaje de lesiones nuevas (47%) y capaces de producir inóculo secundario, ya que tiene mayor porcentaje de geminíferos por lesión nueva (0,25 vrs 1,71%). Lo que da la idea de que el inóculo residual no está siendo efectivo, o bien que, buena parte del inóculo primario está llegando de otra fuente diferente a las lesiones del año anterior, como se pensaba.

Un hecho que refuerza esa especulación es que no fue posible aislar el patógeno en medio de cultivo a partir de lesiones viejas, pero sí de las lesiones nuevas y de lesiones presentes en la vegetación acompañante, ya fueran árboles de sombra o arvenses.

Con respecto a la presencia de *M. citricolor* en otros hospederos diferentes al café, se hallaron 13 registros nuevos en este estudio, a saber, *Anredera cordifolia*, *Crassocephalum crepidioides*, *Dracaena deremensis*, *Hypoestes phyllostachya*, *Myrsine subsessilis*, *Paspalum candidum*, *Phaseolus dumosus*, *Rubus adenothyrus*, *Solanum betaceum*, *Spananthe paniculata*, *Spermacoce assurgens*, *Verbesina turbacensis* y *Senna papillosa*. La mayoría son habitantes típicos de cafetales. Se anota con especial interés los roles que juegan algunos de estos hospederos: *D. deremensis* se utiliza como cerca viva y rompe- vientos, por lo que una práctica común es sembrarla entre lotes, lo que aumenta la posibilidad de dispersión de la enfermedad en áreas libres, además estas hileras de plantas pueden servir de reservorios del patógeno. *M. subsessilis* es un árbol endémico de la zona de Los Santos, por lo que es común encontrarlo creciendo espontáneamente en los cafetales; por otro lado, *S. papillosa* es una especie que se usa como sombra baja, su follaje roza las plantas de café desde el estrato medio, favoreciendo la dispersión y establecimiento del patógeno, al propagar el inóculo y generar microcondiciones de humedad en el dosel.

De todas las especies reportadas como hospederas en esta investigación, se observó que *Hypoestes phyllostachya* presentó la mayor tolerancia al patógeno, ya que estuvo presente en parches con fuerte incidencia de ojo de gallo y la arvense presentó solo una lesión, lo que hace pensar que es una fuente de genes de resistencia a la enfermedad, la cual según Echeverría (2013) debe ser del tipo horizontal o poligénica. De acuerdo a esta característica se podría pensar en estimular su dispersión en los cafetales para tratar de desplazar a aquellas que sean más susceptibles a la enfermedad.

Caso contrario se observó con las especies *A. cordifolia*, *C. verticillata* y *B. calycinum* las cuales mostraron incidencia superiores al 90%. Son especies de muy fácil propagación, por lo que se encuentran distribuidas en áreas extensas y en el caso de las dos primeras, con el agravante de tener el hábito de crecimiento trepador se convierten en un mecanismo de disseminación de la enfermedad muy eficiente.

Es conocido desde los estudios de Carvajal en 1939 que el patógeno tiene un amplio rango de hospederos, sin embargo no se había considerado como fuente de inóculo importante el hongo que se encontraba colonizando esos hospederos, esta es la primera investigación que lo conceptualiza de esa manera y que trata de determinar su impacto en el desarrollo de la enfermedad.

Estudios similares se han realizado en otros patosistemas con el fin de conocer fuentes de inóculo potenciales, por ejemplo en *Cylindrocarpon macrodidymum* en vid se registró que 15 familias de malezas son hospederos del hongo y que los aislamientos recuperados de ellas son capaces de producir enfermedad en uva (Agustí-Brisach *et al.* 2011). Otro ejemplo es el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* en fresa, causante de la pudrición de la corona, un estudio halló que un tercio de la vegetación cercana a las plantaciones de fresa actúan como fuentes de inóculo y se determinó por medio de RAPD, que se trata de la misma población del hongo tanto en hospederos no cultivados como en la fresa (Xiao *et al.* 2004).

Los resultados de este trabajo indican diferencias en el tipo de lesión que se desarrolla en café y en arvenses, así se registró que las lesiones en *A. cordifolia*, *B. calycinum* y *C. verticillata* presentaron mayor diámetro que las que se hallaban en café, ya fuera Caturra o Catimor. Si se comparan solo las variedades de café, las lesiones en CR95 fueron de mayor tamaño que las de Caturra (Figura 2.12).

Por otro lado, las lesiones que se desarrollaron en estas arvenses presentaron anillo mientras que, las de café no o era demasiado tenue para ser medido bajo la metodología utilizada. Los geminíferos, en cualquier hospedero, se desarrollan siempre en el centro de la lesión, lo que le da ventaja a *B. calycinum* que presenta la mayor área central y la mayor cantidad de propágulos.

Un punto importante de recalcar es que no se contabilizaron geminíferos en café pero sí en arvenses, aunque ambos fueron colectados en el mismo período, esto indica, en este caso, que las arvenses están funcionando como fuente de inóculo para nuevas infecciones (Figura 2.13).

Con respecto a la caracterización de la cepas recuperadas de campo, es importante subrayar que la cepa con mayor velocidad de crecimiento fue la que en campo se observó con mayor

cantidad de geminíferos/lesión y la que mostró mayor tamaño de lesión, McBc, por lo que probablemente esta arvense tiene la capacidad de producir más rápidamente inóculo; sin embargo fueron las cepas McCd y McIr las primeras en producir geminíferos, sin necesidad del estímulo de discos de follaje de cafeto. Esto es de relevancia puesto que estas especies se encuentran muy distribuidas en las fincas cafetaleras visitadas.

Una vez que las cepas fueron estimuladas con tejido foliar, nuevamente la cepa McCd, proveniente del árbol de dama, fue de las primeras en desarrollar estructuras, en una cantidad muy similar a las producidas por la cepa proveniente de Caturra; mientras que la cepa recuperada de poró (McEp) produjo 10 veces menos estructuras que las anteriores.

Las cepas desarrollaron micelio blanco levemente espiralado, las McBc, McCd, McCo, McCv y McIn presentaron micelio más compacto, las dos últimas además formaron hebras de micelio y la McCd desarrolló pequeños grumos en el centro de la colonia, características similares fueron descritas por García (2012), para 6 aislamientos obtenidos de lesiones de ojo de gallo provenientes de 6 regiones cafetaleras de Guatemala. Al respecto, López (2001) indica que el color del micelio es una característica fenotípica propia de la especie que no permite distinguir entre aislamientos. También se determinó la densidad del micelio de las cepas, pero no parece haber ninguna relación de este parámetro con la velocidad de crecimiento en medio de cultivo ni con la producción de geminíferos.

Todos los aislamientos evaluados pueden ser colocados en el grupo 2 propuesto por López (2001), con un diámetro promedio de colonia de 79,93 mm a los 8 días de crecimiento *in vitro* y en el que el autor ubicó los aislamientos provenientes de San Marcos de Tarrazú. Lo que indica que, tanto los aislamientos provenientes de café como de arvense comparten características propias de la zona y que probablemente sean diferentes a los que provienen de otras regiones cafetaleras.

Es importante recalcar que los propágulos provenientes de café Catimor-CR95 (McK) tuvieron 100% de eficacia de infección, es decir que todo el inóculo fue viable, mientras que el inóculo recuperado de café Caturra presentó casi 7% de gemas no viables. Además, la posición de las gemas en el momento de la inoculación no tuvo ningún efecto cuando se trató de inóculo proveniente de CR95, ya que el 100% de las gemas germinaron y provocaron

infección, aunque estuvieran mal colocadas. Esto indica que estas estructuras son más patogénicas que las provenientes de los otros hospederos.

Con respecto a la colocación de la gema, ya sea del inóculo proveniente de campo o del producido *in vitro*, se determinó que el éxito de infección depende de la cepa de la cual proviene el inóculo. Así, para el inóculo proveniente de campo de las cepas McK, McSp y McBc y para las cepas que produjeron los geminíferos *in vitro*, McIc, McCc y McCo, no importa si la parte frontal de la gema está en contacto directo con la hoja o solo parte de la gema toca el tejido, tienen la capacidad de germinar y producir infección, en diferentes grados según la fuente.

Caso contrario ocurre con el inóculo proveniente de McCv, McAc y McVol (gemas de campo) y McCd, McEp, McPa, McIn, McSp, McPo, McBc y McCv (gemas *in vitro*) en estos casos la parte frontal de las gemas tiene que estar en contacto con el follaje para que se produzcan lesiones. Una explicación podría ser que hay cepas que contienen mayores cantidades de ácido oxálico que otras, o bien, que la distribución de las hifas infectivas es diferente en algunas cepas, este punto requiere más investigación y ayudaría a entender si el patógeno no produce infección porque es incapaz de penetrar, o si, habiendo penetrado no tiene la capacidad de establecer relaciones con el hospedero. Otro factor que interviene, es el mencionado por Campos (2007), en relación a la condición nuclear de la gema y su capacidad para producir lesiones, aspecto que no fue considerado en esta investigación.

A este respecto, Neri *et al.* (2010) han informado para *Penicillium expansum* que a menores valores de pH intracelular, debidos a la producción deferencial de la toxina patulin, se expresan genes que codifican para la producción de enzimas que degradan las paredes; podría estar ocurriendo algo similar con *M. citricolor* en relación a las posibles diferencias en concentración de ácido oxálico de las cepas estudiadas, las cuales podrían acidificar el tejido de manera diferente y por ello presentar diferencias en agresividad. Según Pariaud *et al.* (2009) en especies necrotróficas la producción de la toxina esta correlacionada con la capacidad de multiplicación del patógeno dentro del hospedero e indica que la condición del hospedero (cantidad de recursos disponibles) puede afectar la interacción hospedero patógeno y la expresión de genes de resistencia. Además, las diferencias en patogenicidad de las cepas, podrían estar relacionadas con cuáles metabolitos secundarios están presentes en

cada fuente de inóculo, así como su concentración, esto podría asociarse a la expresión diferencial de genes relacionado con la agresividad del patógeno

Se debe hacer notar que hay cepas que pierden patogenicidad *in vitro*. Este hecho se refleja en varios parámetros; primero, el porcentaje de éxito de infección se reduce para las cepas producidas *in vitro*, así el inóculo traído de campo de *A. cordifolia* (McAc) presentó un éxito de infección de 65%, mientras que reportó un valor de 53,3% para el inóculo producido *in vitro*; las gemas de campo de *S. papillosa* (McSp) registraron 72,7% de infección y las producidas en laboratorio solo 16,67%; las gemas de Caturra también disminuyeron el valor, de un 93,3% a un 60%. Los valores de gemas no viables, fueron en la mayoría de los casos, mayores para las gemas producidas en medio de cultivo. Esto puede estar explicado por las condiciones fisiológicas del patógeno, así se ha notado pérdida de agresividad en cepas de hongos que han sido mantenidas en diferentes condiciones de almacenamiento o bajo repetidas transferencias (Pariaud *et al.* 2009).

Para el caso de las cepas McBc y McSp, también hubo diferencia en la capacidad de germinación de acuerdo a la colocación; de esta forma las gemas de campo de McBc lograron producir infección en el 16,7% de las veces, aunque estuvieran mal colocadas, mientras que no se registró infección para las gemas mal colocadas si provenían de cultivo *in vitro*. Para la cepa McSp el porcentaje de infección de gemas mal colocadas si provenían de cultivo artificial fue nula, mientras que registró 45,5% si eran de campo. Barquero (2008) también encontró diferencia en el comportamiento de gemas provenientes de campo y gemas producidas en laboratorio, e indica que el inóculo procedente de campo presenta mayor capacidad de infección.

De acuerdo a los datos obtenidos, no se recomienda utilizar inóculo producido en medio de cultivo para realizar ensayos de este tipo, puesto que no refleja las características reales del patógeno, o bien debe establecerse un factor de corrección para inóculo producido *in vitro*.

De las cepas, de campo, que lograron infectar, la proveniente de Catimor produjo síntomas medibles al menos 2 días antes del inicio de producción de lesiones de las otras cepas y registró la mayor velocidad de desarrollo de las lesiones; no fue estadísticamente diferente a la cepa de Caturra, pero sí al resto de cepas. También, es importante recalcar que, la cepa de



CR95 fue la que inició la producción de geminíferos (menor período de latencia) y produjo casi el doble que la de Caturra (mayor cantidad de inóculo secundario), la cual desarrolló el menor tamaño de lesión, aunque se encuentra dentro de los valores típicos reportados por Barquero (2009) para aislamientos provenientes de esta variedad.

Esto significa que, de acuerdo a la fuente de la cual provenga el inóculo, el patógeno presenta diferente grado de agresividad expresado como diferencias en los periodos de incubación y latencia. De acuerdo a Amorim y Pascholati (2011), el período de latencia es un parámetro para evaluar la resistencia de un hospedero a un patógeno y depende de la variedad del hospedero, de la raza el patógeno y de las condiciones ambientales. En este caso la única variable es la cepa de *M. citricolor*, por lo que se puede considerar como una medida de la virulencia o agresividad del patógeno.

De acuerdo a eso, las cepas McK y McBc son las cepas más agresivas, ya que son las que tardan menos tiempo en iniciar con la producción de primordios de geminíferos (menor período de latencia) y producen la mayor cantidad de estructuras (mayor cantidad de inóculo secundario/ mayor fecundidad del inóculo). Luego se encuentran las cepas McAc, McCv, McCa y finalmente McVol. Por lo tanto, se logró determinar que existen diferencias claras en el potencial del inóculo recuperado de fuentes diferentes al café, así mismo entre cepas provenientes de dos variedades de café.

Es de especial importancia lo hallado respecto a la cepa McK. Es conocido que las variedades del grupo de los Catimores son más susceptibles a *M. citricolor* que las otras variedades, incluyendo Caturra, sin embargo es en esta investigación que se determina que el inóculo proveniente de plantas Catimor es más agresivo sobre Caturra que inóculo proveniente del mismo Caturra. Esto es relevante, ya que es conocido también que, en muchas de las plantaciones de café Caturra existen parches de plantas Catimor (sobretudo CR95), lo que aumenta el riesgo de infección de las plantas con inóculo más agresivo, que provocará infecciones más rápidamente y con mayores cantidades de inóculo secundario.

Estos hallazgos son relevantes y están asociados al ciclo epidemiológico del ojo de gallo, ya que períodos de latencia cortos se traducen en mayor número de ciclos de infección, y por ende mayor número de generaciones del patógeno (ciclos secundarios) por ciclo

epidemiológico, lo que influye directamente en la velocidad de desarrollo de la enfermedad (*r*).

Otro dato importante es el hecho que las cepas McBc y McCv permanecieron por más tiempo produciendo geminíferos, lo que refleja que las fuentes respectivas tienen la capacidad de dispersar la enfermedad por tiempos prolongados y que aunque las cepas recuperadas de café habían cesado la producción de inóculo secundario, las arvenses continuaron produciendo inóculo por 4 días más, lo que en campo significa inóculo primario para iniciar nuevas infecciones en el cultivo. Esto fortalece la hipótesis de que existe inóculo primario proveniente de otras fuentes diferentes al café y además, con mayor impacto en la epidemia, al presentar mayores niveles de patogenicidad.

Las cepas McIc, McCc y McCo, del bioensayo con cepas producidas en laboratorio, fueron las únicas capaces de producir infección sin importar la colocación de las gemas y lo hicieron en porcentajes mayores al 50%, lo que hace pensar que son cepas agresivas, ya que como se expuso antes, los propágulos pierden patogenicidad al ser cultivados, pero aún así, estas tres cepas tienen la capacidad de infectar, aunque la parte frontal de la gema no está en contacto con la hoja. Desde el punto de vista epidemiológico, esto es importante, ya que, probablemente este inóculo sea muy efectivo en campo y al ser estas arvenses muy comunes en cafetales, el patógeno cuenta con inóculo potencial para iniciar nuevas infecciones.

El aislamiento McIc fue el primero en producir lesiones, a los 2 ddi, igual que la cepa McK en el bioensayo de inóculo directo de campo. Además de ser uno de los que produjo mayor diámetro de lesión, lo que confirma la idea de que es un aislamiento agresivo y peligroso epidemiológicamente.

Las cepas difieren en cuanto a la velocidad de crecimiento de las lesiones, igual que en el bioensayo 1. En este caso la cepa proveniente de aguacate (McPa) fue la que mostró la mayor velocidad (0,09), muy cercana a la de McK. También, registró el menor período de latencia (12 días), aunque solamente duró 4 días produciendo inóculo secundario, poco tiempo si se compara con la cepa McIc que aunque presentó un período de latencia de 18 días, permaneció produciendo inóculo por 12 días, alargando el período de dispersión del inóculo y

manteniendo una fuente de inóculo primario diferente al cafeto, que en esta prueba no fue capaz de producir inóculo secundario.

Si se asume que las cepas *in vitro* son menos patogénicas, se puede especular que el inóculo de campo proveniente de aguacate es tan agresivo como el originado en Catimor-CR95, por lo que se debe tener especial cuidado en las fincas que utilizan esta especie como sombra alternativa y que además tienen áreas con esta variedad.

Al contrario del inóculo proveniente de aguacate, el originado en poró presentó baja velocidad de desarrollo de las lesiones, las cuales inició a producir hasta el día 12 después de la inoculación, siendo la cepa con el período de incubación más largo y una de las que presentó los mayores períodos de latencia (20 días). Por lo que se considera que el inóculo procedente de aguacate es más agresivo que el de poró. Lo anterior resulta conveniente, ya que se cuantificó un porcentaje de uso como sombra mucho más alto para poró (96%) que para aguacate (22%). Empero, es importante en este punto, retomar la observación hecha en el invierno 2013, donde se notó un área de una finca con una incidencia de la enfermedad mayor al 90%, donde el follaje de poró presentaba también muy alta incidencia y severidad. Esto puede ser debido a que la cepa evaluada no proviene del sitio de la observación o a que el aislamiento perdió mucha patogenicidad al ser mantenido *in vitro* o bien, que requiere de condiciones muy específicas de micrositio para expresar su agresividad.

De acuerdo al IP la cepas provenientes directamente de campo son más patogénicas que las reproducidas en laboratorio y el inóculo proveniente de la arvense *B. calycinum* es el más patogénico de todos.

La cepa McCa\_C presenta un valor bajo con respecto a las cepas recuperadas de Catimor-CR95, *A. cordifolia* y *B. calycinum*. Aunque, al parecer se encuentra dentro de los valores típicos para aislamientos provenientes de café Caturra, ya que Barquero (2009) indica que el 82% de aislamientos de una población de 66 analizados, presentó agresividad baja, entre 1 y 5.

Hay 12 cepas que presentan menor patogenicidad que McCa, por lo que podrían representar menor riesgo de infecciones primarias, sin embargo 11 de ellas fueron cepas producidas en

laboratorio, por lo que el inóculo de campo probablemente sea más agresivo que el representado en este estudio.

Las diferencias en la agresividad de las cepas encontradas en este estudio posiblemente sean debido a que la población del patógeno es muy heterogénea como lo indican Campos (2007) y Barquero (2008). Aunque es importante aclarar que estos autores solo evaluaron y compararon cepas del hongo provenientes de café Caturra, a diferencia de esta investigación, en la que se caracterizan aislamientos provenientes de dos variedades de cafeto, tres árboles de sombra y nueve especies de arvenses. El entendimiento de la agresividad del patógeno es de importancia ya que permite mejorar la efectividad de las prácticas de combate de la enfermedad.

## Conclusiones

1. *M. citricolor* no es capaz de sobrevivir en suelo ni hojarasca.
2. Las lesiones del año anterior no son la única fuente de inóculo primario del ojo de gallo.
3. Existe diferencia en la patogenicidad de cepas de *M. citricolor* recuperadas de diferentes variedades de café.
4. El inóculo proveniente de Catimor-CR95 es más patogénico que el inóculo recuperado de Caturra.
5. Existe diferencia en la patogenicidad de cepas de *M. citricolor* recuperadas de hospederos diferentes al café, como *Anredera cordifolia* y *Bryophyllum calycinum*.
6. La patogenicidad de las cepas de *M. citricolor* estudiadas se disminuye *in vitro*.

## Recomendaciones

1. Continuar con la búsqueda de fuentes de inóculo de *M. citricolor* en la zona de Los Santos y en las otras regiones cafetaleras de Costa Rica.
2. Cuantificar la patogenicidad sobre Caturra y Catuaí del inóculo proveniente de otras variedades de tipo Catimor.
3. Realizar análisis moleculares para comparar poblaciones del hongo.
4. Cuantificar el contenido químico de cada hospedero para tratar de relacionar la agresividad de la cepa con algún componente químico específico por hospedero, ya que esto podría ayudar en la selección precoz de materiales.
5. Cuantificar el contenido de ácido oxálico de cada cepa.
6. Realizar los bioensayos de inoculación sólo con inóculo proveniente directamente de campo.

## Literatura citada

- Achicanoy, H. 2000. Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. Vol.53 (1): 941-968.
- Agustí-Brisach C, Gramaje D, León M, García-Jiménez J, Armengol J. 2011. Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and petri disease pathogens. Plant Dis. 95:803-810.
- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5ed. Elsevier Academic Press. 948p.
- Amorim L, Pascholati S. 2011. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In Manual de fitopatologia.Vol I: Princípios e conceitos. Amorim L, Rezende J.A.M, Bergamin-Filho A. eds. Editora Agronômica Ceres Ltda. p59-99.
- Arauz, LF. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. p. 265-280.
- Avelino, J; Muller, R; Eskes, A; Santacreo, R; Holguín, F. 1999. La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. In Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. IICA, San José, Costa Rica. p. 193-242.
- \_\_\_\_\_; Cabut, S; Barboza, B; Barquero, M; Alfaro, R; Esquivel, C; Durand, JF; Cilas, C. 2007. Topography and crop management are key factors for the development of american leaf spot epidemics on coffee in Costa Rica. Phytopathology 97: 1532-1542.
- Barquero M. 2008. Evaluación de la agresividad de *Mycena citricolor*. Informe Anual de Investigaciones ICAFE. p.100-102.
- Barquero M. 2009. Agresividad de aislamientos de *Mycena citricolor*. Informe Anual de Investigaciones ICAFE. p 82-86.
- Campbell C, Madden L. 1990. Introduction of plant disease epidemiology. Wiley-Interscience Publication. p. 190-191.
- Campos E. 2007. Caracterización molecular de *Mycena citricolor* por RAPD's. Informe Annual de Investigaciones ICAFE. p.66-69.
- Carvajal F. 1939a. Ojo de gallo (*Omphalia flavida*). Revista del Instituto de Defensa del Café de Costa Rica. Tomo7. No.52. p. 535-550.
- Carvajal F. 1939b. Ojo de gallo (*Omphalia flavida*): Segunda parte, la forma perfecta del hongo "*Omphalia flavida*" creciendo libremente en la naturaleza como parásito sobre plantas vivas, en el distrito cafetalero del Zapote (Prov. de San José, CR). Revista del Instituto de Defensa del Café de Costa Rica. Tomo7. No.52. p. 550-565.
- De la Iglesia D, Cascaret L.2000. Especies hospedantes de *Mycena citricolor* (Berk., et Curt.) Sacc. en plantaciones de cafeto (*Coffea arabica* L.). Fitosanidad. Vol. 4 (1-2):21-22.

- Echeverría-Beirute F, Barquero-Miranda M, Gómez-Alpizar L. 2012. Evaluación de la susceptibilidad de genotipos de café (*Coffea* spp.) al hongo *Mycena citricolor* y determinación de genes candidatos de defensa. Boletín Promecafé No. 33. p8-11.
- García J. 2012. Caracterización biológica del hongo *Mycena citricolor* Berk & Curt, con aislamientos obtenidos de cultivares de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de las diferentes zonas cafetaleras de Guatemala, C.A. Tesis Lic. Universidad de San Carlos de Guatemala. 51p.
- Hernández, I. 2009. Diversidad de macrohongos de hojarasca en el bosque estatal de Guajataca. Tesis M.Sc. Universidad del Turubao, Puerto Rico. 93p.
- Kushalappa, A; Ludwig, A. 1982. Calculation of apparent rate in plant disease: development of method to correct for host growth. Phytopathology 72: 1373-1377.
- López A. 2001. Caracterización molecular y morfológica de aislamientos del hongo *Mycena citricolor* colectados en diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica. Tesis M.Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 91p.
- Luttrell E. S. 1974. Parasitism of Fungi on Vascular Plants. Mycologia, Vol. 66 ( 1): 1-15.
- Neri F, Donati I, Veronesi F, Mazzoni D, Mari M. 2010. Evaluation of *Penicillium expansum* isolates for aggressiveness, growth and patulin accumulation in usual and less common fruit hosts. International Journal of Food Microbiology 143: 109-117.
- Nutter, FW. 2007. The rol of plant disease epidemiology in developing successful integrated disease management programs. In General concepts in integrated pest and disease management Ciancio, A; Mukerji, KG. eds. Springer. p. 45-79.
- Pacheco A. 2012. Epidemiología de la enfermedad ojo de gallo del café (*Coffea arabica*) causada por el hongo *Mycena citricolor* Berk & Curt en el área centro occidental de Guatemala, C.A. Tesis Lic. Universidad de San Carlos de Guatemala. 81p.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. Plant Pathology 58 :409–424
- Pliakhnevich M, Ivaniuk V. 2008. Aggressiveness and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* strains in Belarus. Zemdirbyste-Agriculture, Vol 95(3): 379–387.
- Ramírez, C. 1994. Estudio preliminar sobre el efecto del manejo nutricional y de la luz en el contenido de cera cuticular y el uso de coberturas foliares en la infección de *Mycena citricolor* (Berk. y Curt) Sacc. en hojas de café. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 70 p.
- Rayner A.D.M, Watling R, Frankland J.C. 1985. Resource relation: an overview. In Developmental Biology of Higher Fungi. British Mycological Society. D. Moore, L.A. Casselton, D.A. Wood, J.C. Frankland eds. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p.1-40.
- Sequeira, L. 1958. The host range of *Mycena citricolor* (Berk and Curt) Sacc. Turrialba Vol. 8(4): 136-147.

- Vargas, LG. 2004. Bases epidemiológicas para el desarrollo de un sistema de pronóstico en ojo de gallo (*Mycena citricolor* Berk. y Curt) Sacc. en cafeto (*Coffea arabica*). Tesis M.Sc. San José, CR. UCR. 118 p.
- Wang, A; Arauz, LF. 1999. Aplicación de principios epidemiológicos para el combate de ojo de gallo en cafeto. In "Memoria" XI Congreso Agronómico /IV Congreso Nacional de Fitopatología. p. 9-12.
- Wellman, F. 1950. Dissemination of *Omphalia* leaf spot of coffee. Turrialba 1(1):12-27.
- Xiao C, MacKenzie S, Legard D. 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. Phytopathology 94:446-453.



### Capítulo 3. Impacto de la hojarasca y del inóculo primario sobre la epidemia.

---

#### Resumen

Existe la posibilidad de que se mantenga inóculo de *M. citricolor* en el piso del cafetal ya que se conoce que el género *Mycena* es uno de los géneros predominantes dentro de las comunidades de agaricales saprófitos presentes en la hojarasca fresca y madera de los pisos de bosques húmedos tropicales. Como esta enfermedad es de desarrollo lento es más dependiente de la cantidad de inóculo primario que de la tasa de infección, por lo que es relevante determinar el impacto del posible inóculo que puede estar en la hojarasca. De esta forma se pueden proponer estrategias de manejo que consigan reducir el nivel de inóculo inicial en planta y/o hojarasca para tratar de retrasar el desarrollo de la epidemia y así disminuir las pérdidas productivas y económicas. En los años 2013 y 2014 se valoró el efecto de eliminar la hojarasca del piso del cafetal y el inóculo primario del ojo de gallo sobre el desarrollo de la enfermedad. Se evaluaron 1200 bandolas en total, distribuidas en cuatro tratamientos con 150 bandolas por tratamiento por año. Los tratamientos se arreglaron por la combinación de los niveles “con y sin” para cada factor. El experimento fue diseñado como parcelas divididas en 6 bloques completos al azar. Se describió la enfermedad mediante la cuantificación de las variables hojas totales (presentes y caídas), hojas enfermas (presentes y caídas), lesiones y geminíferos, se construyeron las curvas de desarrollo de la enfermedad y se calculó el área bajo la curva (ABCDE) para cada variable, incluyendo porcentaje acumulado de crecimiento y defoliación del hospedero y defoliación de hojas enfermas. Se linealizó la proporción de enfermedad obtenida en cada lectura mediante las funciones de transformación para los modelos de crecimiento monomolecular, logístico y Gompertz, luego se graficó contra el tiempo para calcular la tasa de infección aparente ( $r$ ) para cada curva de desarrollo de cada tratamiento en cada año, las cuales fueron cercanas a 0,04 unidades por día en ambos casos. No se encontró efecto de la interacción de factores sobre las epidemias desarrolladas en el 2013, aunque se notó una posible relación entre enfermedad y crecimiento del hospedero. Para el 2014, se observó un efecto principal del factor inóculo inicial sobre la epidemia, ya que este tuvo mayores niveles de enfermedad final. Se notó un efecto de la hojarasca en segundo plano, porque las parcelas con tratamiento “sin hojarasca” se enfermaron más en términos absolutos. La enfermedad no superó el 25% durante la investigación, lo que pudo influir en la debilidad de las diferencias halladas. De acuerdo a los resultados obtenidos la hojarasca no tiene efecto sobre la epidemia pero el inóculo primario en planta sí afecta el desarrollo de la enfermedad. No se recomienda la remoción de la capa orgánica ni de las hojas enfermas, ya que podría afectar el crecimiento del hospedero y predisponerlo al ojo de gallo.

## Introducción

El cultivo de café bajo sombra ha aumentado en los últimos años, debido a que la disminución en los precios internacionales y el aumento en el “consumismo verde” han permitido comercializarlo como orgánico y venderlo a un mejor precio que el café convencional cultivado a pleno sol, además los árboles de sombra generan ingresos adicionales por la producción de madera, leña y frutos (Albertin y Nair 2004, ICAFE 2011).

En los sistemas agroforestales, los árboles o arbustos de raíces profundas, aumentan la disponibilidad de los nutrientes por medio de la fijación biológica y el reciclaje de nutrientes, aumentan la cantidad de materia orgánica, a través de la hojarasca y los residuos de poda, los cuales reducen a su vez el impacto de las gotas de la lluvia, la velocidad de escorrentía y la erosión, mejoran la estructura, el contenido de N y la retención de nutrientes en el suelo (Beer *et al.* 1998).

Otras ventajas del sistema agroforestal son las de brindar la posibilidad de ofrecer servicios ecosistémicos y mitigar los cambios provocados por el calentamiento global. Se prevé que el incremento en la temperatura media anual en zonas con altitudes mayores a 1000 metros, óptimas para el desarrollo de un grano de alta calidad de exportación y para el progreso de *M. citricolor*, será en promedio de 2,2 °C, lo que influirá directa y negativamente en la calidad del café de altura. Las condiciones de sombra permanentes pueden ser fundamentales para conservar la producción de café en estas zonas, ya que se pueden reducir las temperaturas entre 2 y 3 grados al mediodía. Empero, pueden aumentar los niveles de la enfermedad por favorecer largos períodos de mojadura foliar y elevada humedad relativa (Muschler 1997, Monterroso 1998, Samayoa y Sánchez 2000, Staver *et al.* 2001, Vargas 2004, Avelino *et al.* 2007, DaMatta y Rodríguez 2007, Perfecto *et al.* 2007, Virginio y Abarca 2008, ICAFE 2011, Montenegro 2011, CENICAFE s.f.).

Si las condiciones climáticas son favorables (muy húmedas) y el manejo es inapropiado, la enfermedad es capaz de causar serias pérdidas económicas, debidas básicamente a la defoliación, aunque también puede provocar caída de frutos. El número promedio de lesiones en las hojas antes de que se desprendan es de 20; sin embargo, si se presentan lesiones en la vena central, se produce caída prematura, aunque el número de lesiones en la lámina sea

menor (Carvajal 1939a, Avelino *et al.* 1995, Wang y Avelino 1999, Guerra 2004, Barquero 2007). Lo que produce una capa de hojarasca fresca constituida de follaje enfermo desprendido. De hecho, existe una correlación altamente significativa (76%) entre el índice de infección y el de defoliación en el mismo año (Avelino *et al.* 1995).

Por otro lado, se conoce que el género *Mycena* es uno de los géneros predominantes dentro de las comunidades de agaricales saprófitos presentes en la hojarasca fresca y madera de los pisos de bosques húmedos tropicales. Son colonizadoras y descomponedoras de hojas y madera, tanto en bosques como pasturas, ya que tienen la capacidad de degradar lignina y celulosa, por lo que su función típica es la de causar pudriciones blancas de la madera. Por ejemplo, *M. galopus* es un descomponedor de hojas de roble, su micelio puede abarcar el 80% de la hojarasca en estos bosques y puede permanecer en la hojarasca hasta por dos años. Muchas especies tienen la capacidad de producir metabolitos antifúngicos como las estrobirulinas, lo que les permite desplazar a otros hongos y algunas son capaces de vivir en el humus (Hibbett y Thorn 2001, Moncalvo *et al.* 2002, Cannon y Kirk 2007, Webster y Weber 2007, Hernández 2009).

Además, los basidiocarpos de *M. citricolor* han sido observados en hojas de diferentes especies vegetales caídas y en descomposición sobre el suelo, tanto en el bosque como en cultivos de cafeto (Carvajal 1939a y b, Dennis 1961, Buller 1958).

Por lo anterior existe la posibilidad de que se mantenga inóculo de *M. citricolor* en el piso del cafetal y debido a que esta enfermedad es de desarrollo lento, es más dependiente de la cantidad de inóculo primario que de la tasa de infección, lo que supone que la ejecución de estrategias de manejo que consigan reducir el nivel de inóculo inicial lograrían retrasar considerablemente el desarrollo de la epidemia y por ende disminuir las pérdidas productivas y económicas.

Para reducir el inóculo primario es de suma importancia conocer donde está ubicado, según Avelino *et al.* (1999), en el ojo de gallo, al igual que para la roya anaranjada, la mayor fuente de inóculo inicial es el inóculo presente en las lesiones producidas el año anterior, denominado inóculo residual (IR). El cual se mantiene en estado latente en lesiones viejas

durante la época seca y activa su crecimiento cuando entran las primeras lluvias (Carvajal 1939a, Bonilla 1980, Ramírez 1994).

Se ha informado que existe una correlación positiva entre el inóculo residual, medido como porcentaje o número de hojas viejas con lesiones (hojas nacidas en el año "n-1") observadas en el año "n" y el porcentaje de lesiones capaces de producir cabecitas al inicio de la estación lluviosa del año "n"; así, se observa un adelanto en el desarrollo de la epidemia en los cafetales que presentan mayor cantidad de inóculo residual (Avelino *et al.* 1995, Wang y Avelino 1999).

Es relevante determinar si el hongo se encuentra sobreviviendo solamente en las lesiones o también como habitante en el suelo o la hojarasca; así como, conocer el impacto de cada fuente de inóculo, para luego trabajar en estrategias que logren reducir al máximo la (s) fuente (s) más importante (s).

Debido a ello se planteó esta investigación, tendiente a determinar el impacto de la hojarasca y del inóculo primario sobre la epidemiología del ojo de gallo.

## **Materiales y Métodos**

La investigación se realizó en las fincas CAT, CO, FI, G7 en el año 2013 y CAT, CO en el 2014. Todas las plantas evaluadas eran de la variedad Catuaí. Los ensayos se establecieron al final de la época seca y las evaluaciones iniciaron al inicio de la época lluviosa.

### **1. Caracterización de las áreas de estudio**

Se eligieron áreas de aproximadamente 400 m<sup>2</sup> en cada finca, en los que de acuerdo a la experiencia del productor o encargado, se ha presentado históricamente la enfermedad en similar magnitud.

Para el ensayo del 2013 se realizó un análisis químico de suelo en cada área y de follaje a las plantas en cada tratamiento.

Se caracterizó cada área donde se establecieron los tratamientos del ensayo del año 2013 de acuerdo a la altura de las plantas, el número de tallos por planta, la cantidad, diámetro y género de árboles de sombra.

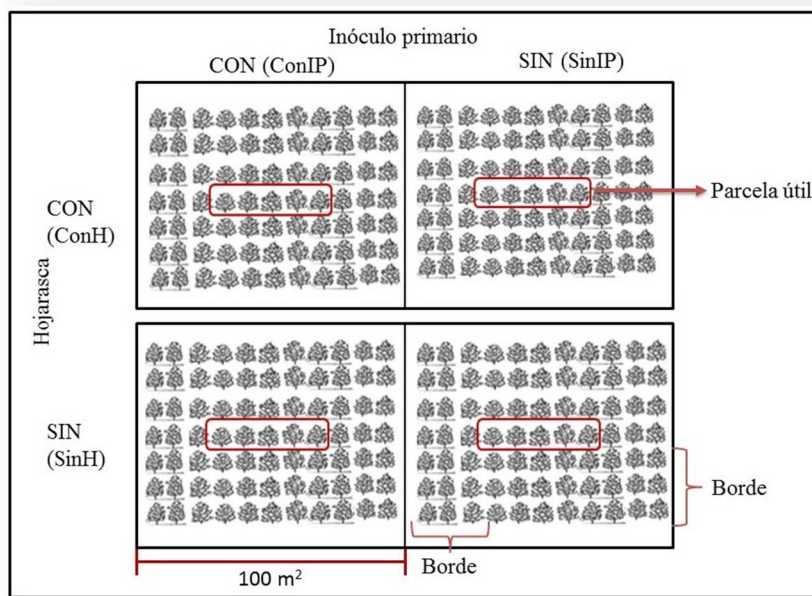
Para el año 2014, se registró la presencia de vegetación acompañante y se identificaron los géneros más frecuentes.

## **2. Establecimiento de los ensayos**

El diseño de los tratamientos fue de parcelas divididas con dos factores: hojarasca (H) e inóculo primario (IP), cada factor tuvo dos niveles, de acuerdo a si se removió o no el factor; así, el factor H que fungía como parcela primaria, contó con los niveles “con hojarasca” (ConH) si no hubo remoción y “sin hojarasca” (SinH) en el caso que fue removida. El factor IP (parcela secundaria) se componía del nivel “con inóculo primario” (ConIP) cuando no se eliminaron las hojas con lesiones y “sin inóculo primario” (SinIP) si se eliminaron las hojas enfermas. La eliminación del inóculo se hizo por medio de defoliación manual de todas las hojas que presentaban lesiones, ya fueran del año anterior o nuevas (Figura 3.1).

La remoción de la capa de hojarasca se realizó cada 14 días, para de esta forma mantener la parcela en condición de suelo desnudo (Figura 3.2).

El diseño experimental fue de bloques completos al azar, con 6 bloques y 4 tratamientos. La parcela útil fue de 5 plantas y el borde de tres. Se evaluaron 5 bandolas por planta distribuidas en el tercio inferior, medio y superior, siempre en la misma posición de acuerdo al número de bandola (Figura 3.3). Para un total de 600 bandolas evaluadas cada año.



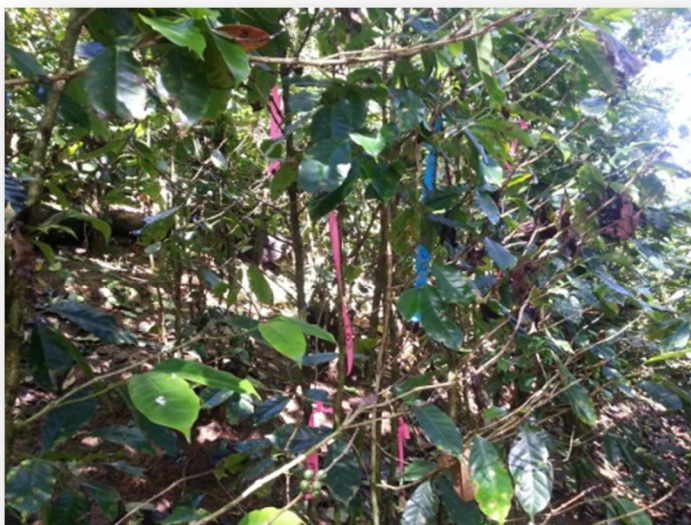
**Figura 3.1.** Diagrama del arreglo de tratamientos por bloque para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013 y 2014.

El tratamiento ConH/ConIP en el que no se removió la hojarasca ni el inóculo primario, es el que representa el manejo tradicional de la plantación y es el tratamiento testigo en el ensayo.

Las plantas de estas áreas se mantuvieron bajo el manejo rutinario de las fincas (Figura 3.4).



**Figura 3.2.** Comparación de tratamientos con remoción (A) y sin remoción (B) de hojarasca para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013 y 2014.



**Figura 3.3.** Marcaje de bandolas en plantas evaluadas para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013 y 2014.

Cada 14 días se cuantificó, en la zona de crecimiento nuevo de las bandolas, la cantidad de hojas por nudo, la cantidad de hojas enfermas, la cantidad de lesiones en cada hoja y la cantidad de geminíferos activos<sup>12</sup> por hoja. No se tomó en cuenta la ramificación secundaria de los nudos.

Durante la prueba se registraron los valores de temperatura, humedad relativa, precipitación y período de mojadura foliar por medio del colector de datos meteorológicos “WatchDog 1000 series” (Figura 3.5).

---

<sup>12</sup> geminíferos erectos de color amarillo brillante y no geminíferos que aunque presentes estaban deshidratados o inmaduros.





**Figura 3.4.** Aplicación de cal en parcelas experimentales de los tratamientos con remoción (A) y sin remoción (B) de hojarasca, Zona de Los Santos, 2013 y 2014.



**Figura 3.5.** Aparatos meteorológicos ubicados en parcelas experimentales de los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013 y 2014. A. Sensor de mojadura foliar, B. Colector de datos meteorológicos WatchDog 1000 series con sensores internos de temperatura del aire y humedad relativa, C. Sensor de lluvia y cobertor meteorológico.

### 3. Manejo y análisis de los datos

Con los datos colectados se calculó para cada evaluación la cantidad de hojas sanas presentes, nuevas y caídas; cantidad de hojas enfermas presentes, nuevas y caídas; cantidad de lesiones presentes, nuevas y caídas; cantidad de geminíferos presentes, nuevos y caídos; porcentaje acumulado de crecimiento y de defoliación.



Con los datos recopilados se determinaron los índices D1, D2 y D3 con el fin de describir las epidemias estudiadas en cada año.

El cálculo de los descriptores para las variables “hojas enfermas” y “lesiones” se muestran a continuación:

D1: porcentaje instantáneo de la enfermedad

$$D1 = 100 * (It / HTt)$$

Donde:

It = incidencia de la enfermedad expresada como hojas enfermas o lesiones en el tiempo t

t = fecha de evaluación

HTt = hojas totales en el tiempo t

D2: porcentaje acumulado de la enfermedad

$$D2 = 100 * (Iact / HTact)$$

Donde:

Iact = incidencia de la enfermedad expresada como hojas enfermas o lesiones acumuladas en el tiempo t

t = fecha de evaluación

HTact = hojas totales acumuladas en el tiempo t

D3: porcentaje acumulado final de la enfermedad

$$D3 = 100 * (Dact / HTacf)$$

Donde:

Dact = incidencia de la enfermedad expresada como hojas enfermas o lesiones acumuladas en el tiempo t.

t = fecha de evaluación

HTacf=hojas totales acumuladas en el tiempo f

f = tiempo final = última evaluación

Para la variable “geminíferos” los índices se calcularon de la siguiente manera:

D1: porcentaje instantáneo de la enfermedad

$$D1 = 100 * (It / LTt)$$

Donde:

It = intensidad de la enfermedad expresada como geminíferos activos presentes en el tiempo t

t = fecha de evaluación

LTt= lesiones totales en el tiempo t

D2: porcentaje acumulado de la enfermedad

$$D2 = 100 * (Iact / LTact)$$

Donde:

Iac = intensidad de la enfermedad expresada como geminíferos activos acumulados en el tiempo t

t = fecha de evaluación

LTact = lesiones totales acumuladas en el tiempo t

D3: porcentaje acumulado final de la enfermedad

$$D3 = 100 * (Iact / LTacf)$$

Donde:

Iact = intensidad de la enfermedad expresada como geminíferos activos acumulados en el tiempo t.

t = fecha de evaluación

LTacf = lesiones totales acumuladas en el tiempo f

f = tiempo final = última evaluación

Luego, se calculó el área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) para cada descriptor,

$$ABCDE = \sum^{n-1} ((y_i + y_{i+1})/2) * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde:

n= número de evaluaciones

y= cantidad de la enfermedad (expresada como D1, D2 ó D3)

t= tiempo en días

De esta forma, se contó con área bajo la curva del desarrollo de la enfermedad (**ABCDE**) para cada descriptor, a saber: **HED1**, porcentaje instantáneo de hojas enfermas; **HED2**, porcentaje acumulado de hojas enfermas; **HED3**, porcentaje acumulado final de hojas enfermas; **LD1**, porcentaje instantáneo de lesiones; **LD2**, porcentaje acumulado de lesiones; **LD3**, porcentaje acumulado final de lesiones; **GD1**, porcentaje instantáneo de geminíferos; **GD2**, porcentaje acumulado de geminíferos; **GD3**, porcentaje acumulado final de geminíferos.

Los índices fueron usados para describir el desarrollo de la enfermedad y la respuesta del hospedero en cuanto a los procesos de crecimiento y defoliación.

Así, se calculó el descriptor D3 para crecimiento, defoliación total y defoliación de hojas enfermas de la siguiente manera:

#### Crecimiento del hospedero

$$D3 = 100 * (HPact/HPacf)$$

Donde:

HPact = hojas presentes acumuladas en el tiempo t

t = fecha de evaluación

HPacf = hojas presentes acumuladas en el tiempo f

f = tiempo final = última evaluación

#### Defoliación total

$$D3 = 100 * (HCact / HPacf)$$

Donde:

HCact = hojas caídas acumuladas en el tiempo t

t = fecha de evaluación

HPacf = hojas presentes acumuladas en el tiempo f

f = tiempo final = última evaluación

#### Defoliación de hojas enfermas

$$D3 = 100 * (HECact / HPacf)$$

Donde:

HECact = hojas enfermas caídas acumuladas en el tiempo t

t = fecha de evaluación

HPacf = hojas presentes acumuladas en el tiempo f

f = tiempo final = última evaluación

Luego, se calculó el área bajo la curva del desarrollo (**ABCD**) del crecimiento (**Crec**) la defoliación total (**Def**) y la defoliación de hojas enfermas (**DefHE**).

Se eligieron los índices acumulados finales (D3) de las variables hojas enfermas y lesiones porque estos describen la enfermedad corregida por el crecimiento del hospedero.

Se eligió el índice D1, porcentaje instantáneo, para mostrar la curva de progreso de la cantidad total de geminíferos presentes en cada fecha de evaluación, ya que los porcentajes acumulados D2 y D3 no describen de manera adecuada esta variable.

Se construyó la curva de desarrollo de la enfermedad como % de incidencia acumulada final por fecha de evaluación (D3) y como % acumulado final de lesiones (D3) para cada tratamiento en cada año de estudio.

Se usaron las curvas de desarrollo de la enfermedad como hojas enfermas (incidencia) para determinar el modelo de mejor ajuste de crecimiento de las epidemias en cada tratamiento en cada año. Primero, se linealizaron las curvas de desarrollo de la enfermedad usando el parámetro  $K$  para corregir la proporción de enfermedad máxima, ya que las epidemias no cumplieron con el supuesto de  $y_{max}=1$ .

Las funciones de transformación para cada modelo, según Campbell y Madden (1990), son  $\ln(y/K-y)$  para el modelo logístico,  $\ln[K/(K-y)]$  para el modelo monomolecular y  $-\ln[-\ln(y/K)]$  para el Gompertz. Una vez transformada la variable se procedió a realizar un análisis de regresión lineal simple para la variable transformada contra el tiempo en días, para cada tratamiento en cada año de estudio. Con este análisis se consiguió la ecuación de regresión de la forma  $y=mx+b$  para cada epidemia. Donde, la pendiente ( $m$ ) representa la tasa de infección aparente ( $r$ ) de cada epidemia para cada modelo.

Por medio de este análisis se obtuvo el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el promedio de cuadrados del error y la probabilidad de la regresión. Parámetros útiles en la evaluación de los modelos y usados como criterio de elección del modelo más apropiado para describir el progreso de la enfermedad en el tiempo. Además, se graficaron las curvas de residuos estándares contra valores de enfermedad predichos para determinar la bondad de ajuste de cada modelo.

También, se calculó el parámetro Rho ( $\rho$ ) que es la tasa absoluta ponderada del incremento de la enfermedad, para poder realizar comparaciones entre las tasas de infección aparente entre diferentes modelos de crecimiento de la enfermedad. El cálculo de  $\rho$  se hizo de acuerdo a la ecuación Richards (Campbell y Madden 1990):

$\rho = r / 2m+2$ , donde  $r$  es la tasa de infección aparente para cada modelo y  $m$  es un parámetro de forma, que toma distintos valores dependiendo del modelo de crecimiento de la epidemia; así para el modelo logístico  $m=2$ , en el modelo monomolecular  $m=0$  y en el Gompertz  $m=1$ .

Se realizó un ANDEVA para determinar si existían diferencias entre bloques, factores e interacción de factores (tratamientos) para las variables: 1. Acumulado final de hojas enfermas, 2. Acumulado final de lesiones, 3. Acumulado final de geminíferos, 4. Promedio de lesiones por hoja, 5. Promedio de geminíferos por lesión, 6. Porcentaje de lesiones con geminíferos, 6. HED3, 7. LD3, 8. GD3, 9. Crec, 10. Def, 11. DefHE. Luego se realizó la prueba de comparación de medias LSD de Fischer al 95 % de confianza, para determinar la magnitud de la diferencia.

Se evaluó la homogeneidad y normalidad de las variables previo al ANDEVA y al análisis de correlaciones para determinar la significancia de los tratamientos y las asociaciones.

Debido a la naturaleza de alta variabilidad de las variables evaluadas, las matrices de correlación se hicieron por medio de la técnica bivariada no paramétrica de Spearman, con confiabilidades de 95% y 99%. Así se declararon diferencias estadísticas si  $p < 0,05$  o  $p < 0,01$ .

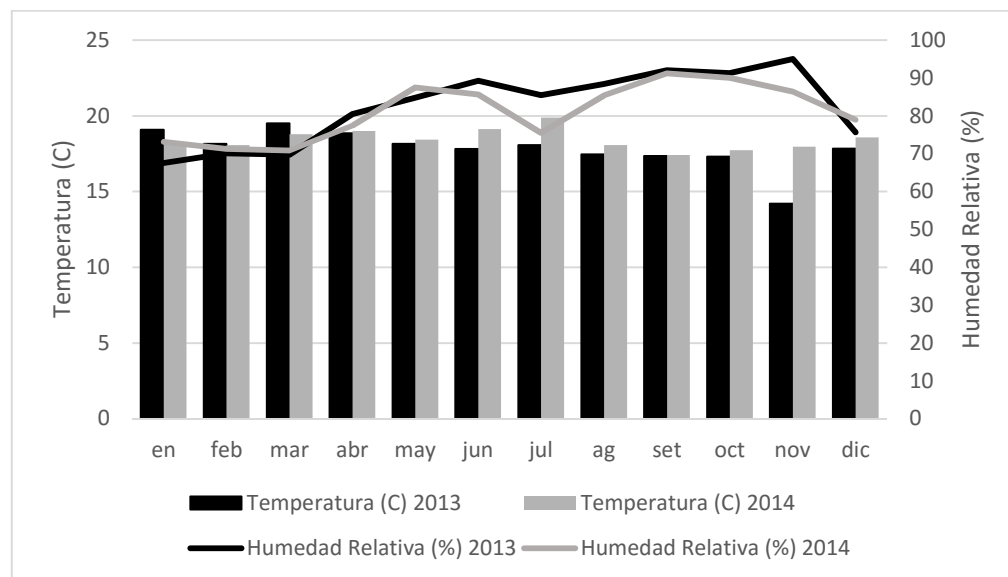
Se calcularon los coeficientes de correlación para las variables hojas enfermas, lesiones totales, gemas totales, lesiones por hoja y gemas por lesión en asociación con las variables ambientales, humedad relativa, precipitación, mojadura foliar y temperatura, presentes en cada tratamiento evaluado.

Los datos se analizaron por medio de los programas de análisis estadísticos Infostat versión 2015 (Di Rienzo *et al.* 2015) y RStudio (versión 0.99.473-2009-2015). Las gráficas se realizaron con la opción de gráficos de Excel de Microsoft Office 2013.

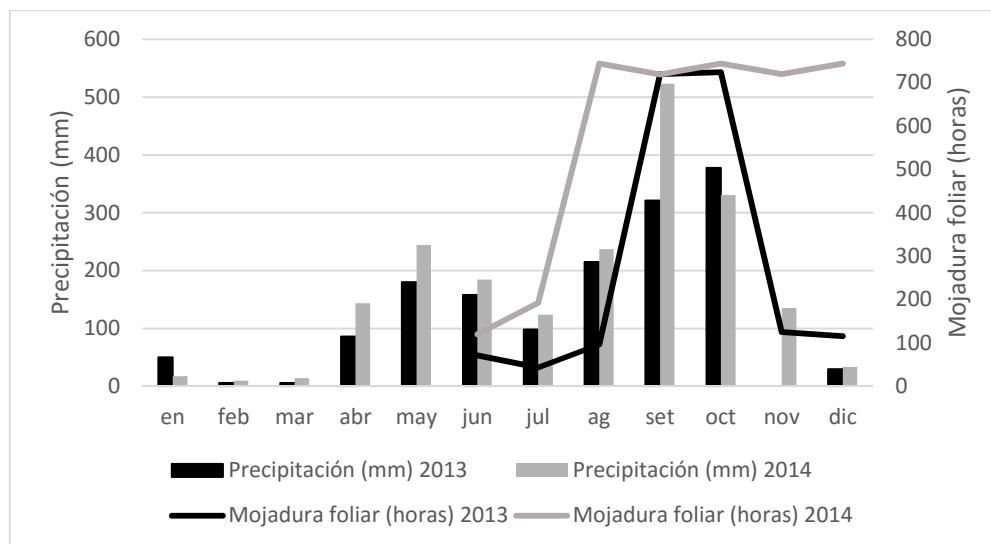
En el Cuadro 3.1 se muestran los totales de lluvia y los mínimos y máximos de temperatura. Durante los años en estudio se presentaron las condiciones ambientales que se muestran en la Figura 3.6 y la Figura 3.7.

**Cuadro 3.1.** Temperaturas (°C) mínima y máxima y precipitación acumulada para los años de estudio. Zona de los Santos, 2013-2014.

Año	Temperatura (°C)		Precipitación (mm)
	Mínima	Máxima	
2013	14,2	22,3	1527
2014	16,0	22,3	1997



**Figura 3.6.** Condiciones de temperatura (°C) y humedad relativa (%) de la zona de estudio. Zona de Los Santos, 2013 -2014.



**Figura 3.7.** Condiciones de precipitación (mm) y mojadura foliar (horas) de la zona de estudio. Zona de Los Santos, 2013-2014.

## Resultados

### 1. Año epidemiológico 2013

En las áreas donde se ubicó el tratamiento ConH/SinIP se registró un promedio mayor de cantidad de árboles y la altura de las plantas fue levemente mayor en estas áreas también. El diámetro de los árboles de sombra fue mayor en las áreas con los tratamientos ConH/ConIP y ConH/SinIP (Cuadro 3.2).

Las áreas donde se ubicaron todos los tratamientos presentan valores adecuados de nutrientes, solo el K y el Fe se encuentran por encima de lo recomendado para el cultivo, todas las plantas evaluadas presentaron contenidos de elementos dentro o muy cercano a los rangos establecidos como óptimos para café (Cuadro 3.3 y Cuadro 3.4).



**Cuadro 3.2.** Altura (cm) de plantas, número de tallos por planta y altura (cm), diámetro (cm) del tronco principal y género de los árboles presentes en las áreas de estudio donde se ubicó cada tratamiento del ensayo remoción de hojarasca y remoción de inóculo inicial. Zona de Los Santos, 2013.

Característica	Tratamiento			
	ConH/ConIP	ConH/SinIP	SinH/ConIP	SinH/SinIP
Altura de plantas (cm)	228,27±5,85	237,83±5,82	216,00±8,45	217,60±5,71
Número de tallos/planta	2,70±0,25	2,53±0,25	2,59±0,19	2,10±0,16
Altura de árboles (cm)	630,91±36,43	572,97±37,30	614,63±20,00	629,69±18,17
Diámetro de árboles (cm)	52,30±4,67	44,71±4,25	26,61±2,23	28,66±2,38
Cantidad total de árboles	38	49	43	32
Género del árbol	<i>Annona,</i> <i>Erythrina,</i> <i>Persea, Musa,</i> <i>Psidium</i>	<i>Annona,</i> <i>Erythrina,</i> <i>Persea, Musa,</i> <i>Psidium</i>	<i>Acnistus,</i> <i>Erythrina,</i> <i>Dracaena,</i> <i>Persea, Musa,</i> <i>Psidium</i>	<i>Eucaliptus,</i> <i>Erythrina,</i> <i>Persea</i>

**Cuadro 3.3.** Contenido nutricional del suelo en las áreas de estudio donde se ubicó cada tratamiento del ensayo de remoción de hojarasca e inóculo primario. Zona de Los Santos, 2013.

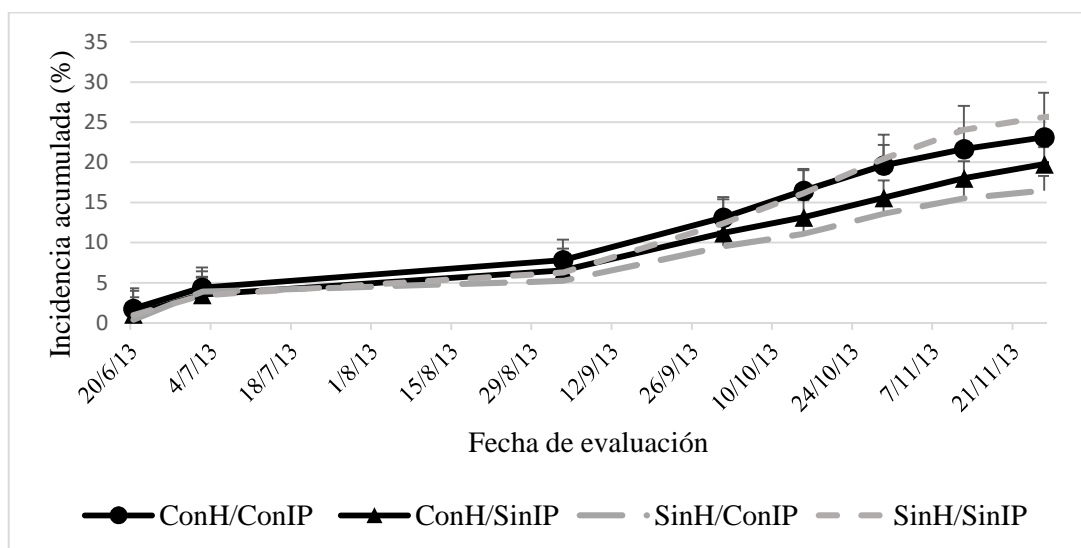
Tratamiento	Característica											
	pH	ACIDEZ	Ca	Mg	K	CICE	%SA	P	Zn	Cu	Fe	Mn
			cmol(+)/L						mg/L			
	5,5	>0,3	4-20	1-10	0,2	5	<10	10-30	3-15	1-20	10-50	5-50
ConH/ConIP	5,39	0,38	9,54	2,41	0,52	12,85	3,10	20,15	5,81	7,27	228,57	41,03
ConH/SinIP	5,56	0,26	8,60	2,48	0,63	11,97	2,66	23,38	5,97	9,21	199,52	49,34
SinH/ConIP	5,32	0,30	9,51	2,48	0,60	12,88	2,75	14,27	9,09	5,43	219,35	29,21
SinH/SinIP	5,49	0,54	10,39	2,73	0,54	14,21	3,76	18,35	7,00	5,70	216,61	26,66

**Cuadro 3.4.** Contenido nutricional del follaje de las plantas ubicadas en cada tratamiento del ensayo de remoción de hojarasca e inóculo primario. Zona de Los Santos, 2013.

Tratamiento	Elemento												
	N	P	Ca	Mg	K	S	Na	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Al
	%						mg/L						
	2,5-3,5	0,15-0,35	0,8-1,6	0,3-0,5	2,0-3,0	0,25-0,50	90-300	10-50	15-200	50-300	25-75		
ConH/ConIP	3,02	0,14	1,19	0,40	2,13	0,20	20,64	134,17	13,50	11,50	219,17	43,00	49,17
ConH/SinIP	3,05	0,15	1,24	0,39	2,19	0,21	21,80	140,00	13,67	11,33	245,17	45,83	51,83
SinH/ConIP	3,11	0,14	1,10	0,37	2,20	0,20	18,66	123,50	13,17	11,67	162,83	35,83	41,33
SinH/SinIP	2,94	0,13	1,19	0,35	2,14	0,19	17,11	117,83	12,50	13,17	174,00	36,67	49,83

La enfermedad para el invierno 2013 tuvo un máximo cercano al 25% de incidencia, presentando el tratamiento SinH/ConIP la menor incidencia, 16,5% (Figura 3.8).

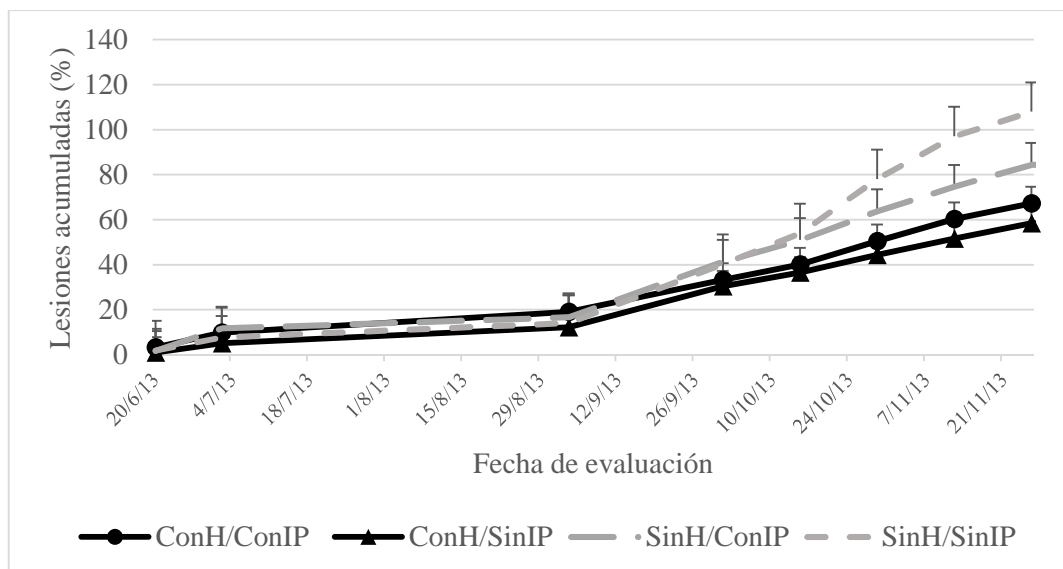
El desarrollo de las lesiones, expresado por medio del descriptor D3 (porcentaje acumulado de lesiones en cada fecha de evaluación entre la cantidad total de hojas que presentó el hospedero) inició su incremento a inicios de setiembre y presentó los menores valores en los tratamientos sin remoción de hojarasca (Figura 3.9).



**Figura 3.8.** Curva de desarrollo de la enfermedad expresada como incidencia acumulada (%) de hojas con lesiones de ojo de gallo. Zona de Los Santos, 2013.

El total de lesiones contabilizadas en todos los tratamientos, fue de 3276 de las cuales solo el 35% produjo geminíferos.

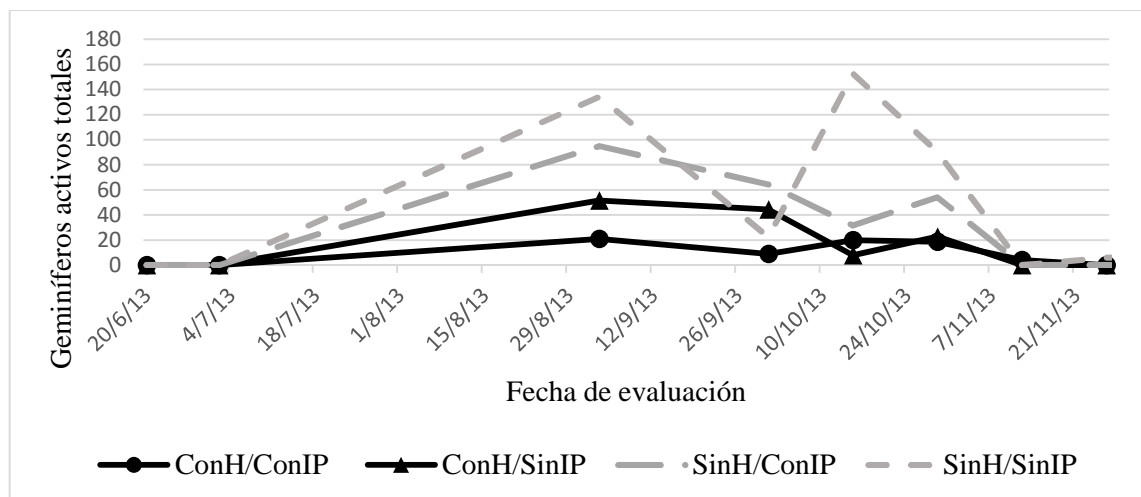
La cantidad máxima de geminíferos fue obtenida en el tratamiento SinH/SinIP en dos fechas de evaluación específicas, el 3/9/13 y 15/10/13. Los tratamientos ConH/SinIP y SinH/ConIP presentaron máximos en las mismas fechas de evaluación, 3/9/13, 1/10/13 y 29/10/13, pero con valores inferiores al SinH/SinIP. El tratamiento con menor cantidad de propágulos fue el testigo (ConH/ConIP)(Figura 3.10).



**Figura 3.9.** Curva de desarrollo de la enfermedad expresada como lesiones acumuladas (%) de ojo de gallo. Zona de Los Santos, 2013.

Los tratamientos de remoción de hojarasca con y sin inóculo inicial fueron los que registraron mayor cantidad de lesiones, geminíferos activos, lesiones por hoja y % de lesiones con geminíferos, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para ninguna de estas variables (Cuadro 3.5).

El tratamiento SinH/SinIP fue el que presentó el mayor valor de área bajo la curva de desarrollo de hojas enfermas (HED3), lesiones (LD3) y geminíferos activos (GD3), no se encontraron diferencias significativas entre los valores calculados para cada tratamiento (Cuadro 3.6).



**Figura 3.10.** Curva de desarrollo de geminíferos activos de *Mycena citricolor* en los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario. Zona de Los Santos, 2013.

**Cuadro 3.5.** Hojas enfermas, lesiones y geminíferos activos totales, promedio de lesiones por hoja y porcentaje promedio de lesiones con geminíferos para todo el período de evaluación de los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.

Tratamiento	Variable				
	Hojas enfermas	Lesiones	Geminíferos activos	Lesiones/hoja	Lesiones con geminíferos
ConH/ConIP	239 <sup>a</sup>	652 <sup>a</sup>	255 <sup>a</sup>	0,96±0,22 <sup>a</sup>	11,91±2,49 <sup>a</sup>
ConH/SinIP	200 <sup>a</sup>	575 <sup>a</sup>	432 <sup>a</sup>	0,87±0,25 <sup>a</sup>	25,38±5,28 <sup>a</sup>
SinH/ConIP	182 <sup>a</sup>	952 <sup>a</sup>	1163 <sup>a</sup>	1,26±0,48 <sup>a</sup>	26,47±7,30 <sup>a</sup>
SinH/SinIP	255 <sup>a</sup>	1097 <sup>a</sup>	1635 <sup>a</sup>	1,18±0,30 <sup>a</sup>	37,40±6,58 <sup>a</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acuerdo a la prueba LSD Fischer.

**Cuadro 3.6.** Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad de acuerdo al % acumulado final de hojas enfermas (HED3), % acumulado final de lesiones (LD3) y % acumulado final de geminíferos activos (GD3), para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.

Tratamiento	ABCDE		
	HED3	LD3	GD3
<b>ConH/ConIP</b>	1784,37 <sup>a</sup>	4542,80 <sup>a</sup>	1242,50 <sup>a</sup>
<b>ConH/SinIP</b>	1482,23 <sup>a</sup>	3672,82 <sup>a</sup>	2237,67 <sup>a</sup>
<b>SinH/ConIP</b>	1287,88 <sup>a</sup>	5321,24 <sup>a</sup>	5748,17 <sup>a</sup>
<b>SinH/SinIP</b>	1803,86 <sup>a</sup>	6074,72 <sup>a</sup>	8503,83 <sup>a</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acuerdo a la prueba LSD Fischer.

El modelo de crecimiento logístico presenta los mayores coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y menores cuadrados medios del error, no se encontró dispersión aleatoria al graficar los residuos estandarizados contra los valores de enfermedad predichos en ninguno de los análisis de regresión realizados para los modelos evaluados. La tasa de infección ( $r$ ) fue prácticamente la misma, 0,04 unidades por día, para todos los tratamientos (Cuadro 3.7).

Los tratamientos sin remoción de inóculo inicial (ConH/ConIP y SinH/ConIP) presentan los mayores valores de crecimiento acumulado (Figura 3.11).

Todos los tratamientos se comportaron de forma muy similar en cuanto a defoliación total del hospedero, el tratamiento ConH/ConIP mostró una curva levemente más alta (Figura 3.12).

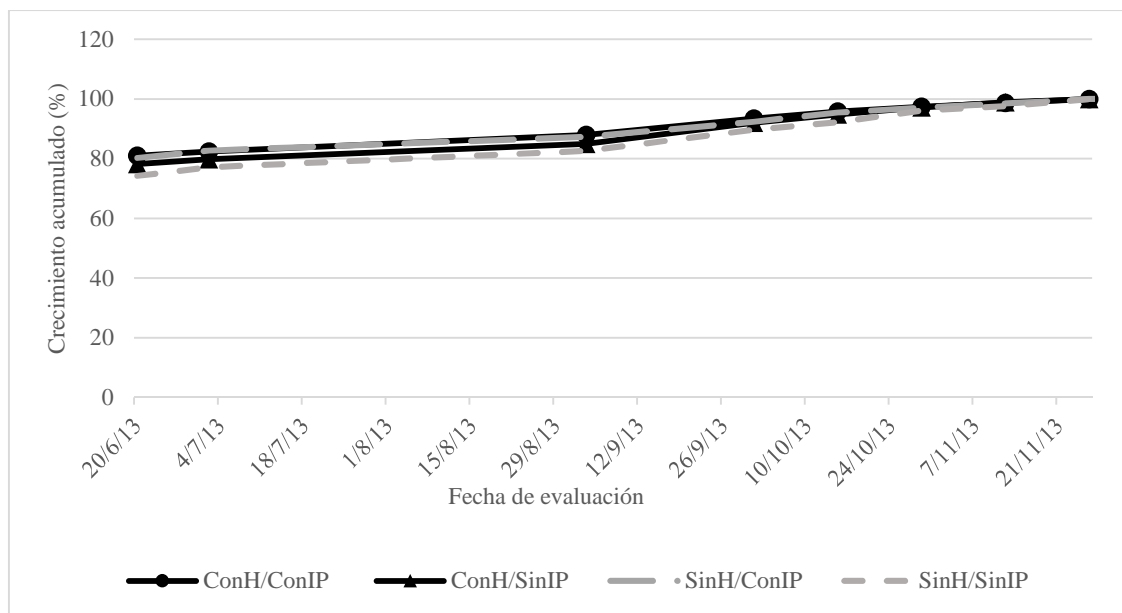
**Cuadro 3.7.** Resumen de los estadísticos del análisis de regresión lineal simple usados en la evaluación de la conveniencia de los modelos monomolecular, logístico y Gompertz para describir el progreso del ojo de gallo en cada tratamiento de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.

Tratamiento	Modelo	R <sup>2</sup> (%)	Cuadrado medio del error	Residuos Estandarizados	Ecuación de regresión	<i>p</i> <sup>(1)</sup>	<i>r</i> <sup>(2)</sup>	<i>ρ</i> <sup>(3)</sup>
ConH/ConIP	Monomolecular	49,09	3,09	nda	y = 0,0291x - 0,9672	0,035	0,0291	0,0145
	Logístico	70,86	2,81	nda	y = 0,044x - 3,152	0,004	0,044	0,0073
	Gompertz	59,15	3,01	nda	y = 0,0351x - 3,3436	0,015	0,0351	0,0087
ConH/SinIP	Monomolecular	45,95	3,16	nda	y = 0,0276x - 0,9306	0,045	0,0276	0,0138
	Logístico	70,28	2,86	nda	y = 0,0437x - 3,2848	0,005	0,0437	0,0072
	Gompertz	57,08	3,073	nda	y = 0,034x - 3,5156	0,018	0,0437	0,0109
SinH/ConIP	Monomolecular	51,31	2,47	nda	y = 0,0271x - 0,8839	0,030	0,0271	0,0135
	Logístico	75,79	2,30	nda	y = 0,0452x - 3,4601	0,002	0,0452	0,0075
	Gompertz	63,12	2,39	nda	y = 0,034x - 3,7003	0,010	0,034	0,0085
SinH/SinIP	Monomolecular	36,58	9,89	nda	y = 0,0402x - 1,6429	0,084	0,0402	0,0201
	Logístico	70,26	3,50	nda	y = 0,0484x - 3,8354	0,005	0,0484	0,0080
	Gompertz	56,30	3,76	nda	y = 0,037x - 3,5628	0,020	0,037	0,0092

nda: no hay dispersión aleatoria alrededor de la línea de predicción al graficar los residuos estandarizados contra los valores de enfermedad predichos.

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación (suma de cuadrados del error/cuadrado medio del error), <sup>(1)</sup>: probabilidad de la regresión, <sup>(2)</sup>: tasa de infección aparente,

<sup>(3)</sup>:parámetro Rho (tasa absoluta ponderada de incremento de la enfermedad) para comparación entre tasas de infección aparente de los diferentes modelos.

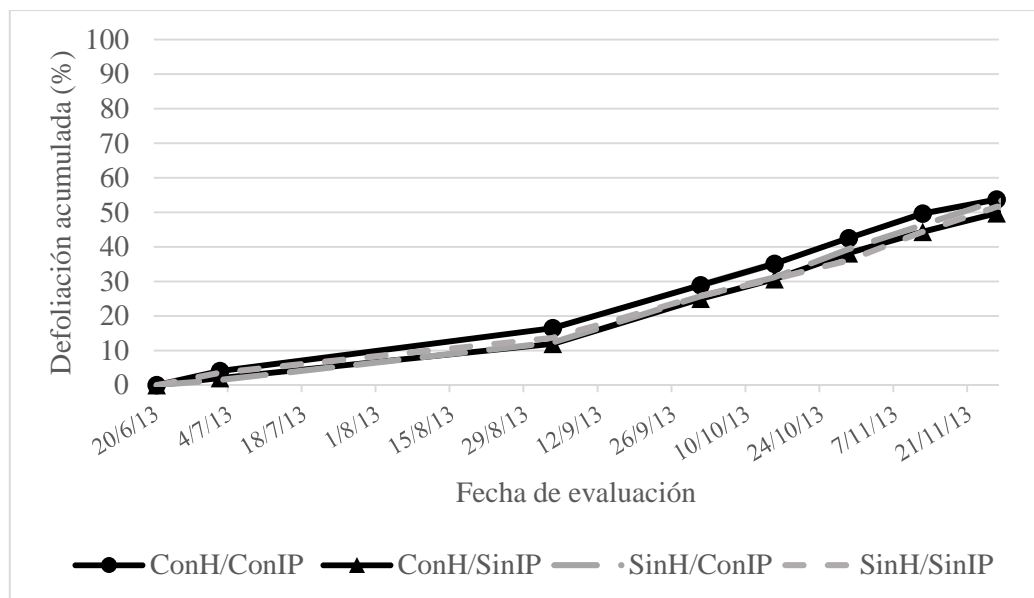


**Figura 3.11.** Progreso del crecimiento del hospedero para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.

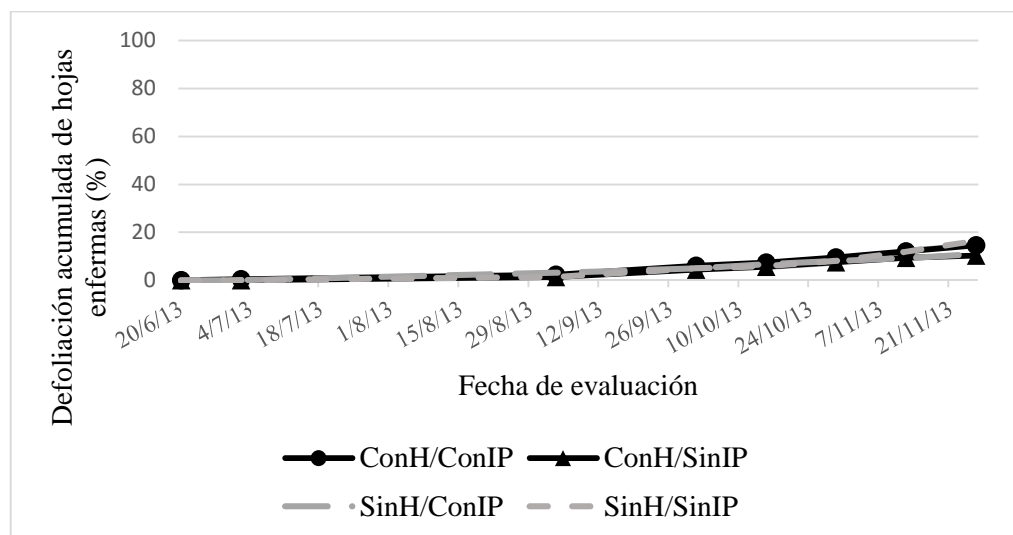
Situación similar ocurre en el progreso de la defoliación de hojas enfermas, excepto para el tratamiento SinH/SinIP que al final de la epidemia aumenta la cantidad de hojas caídas con ojo de gallo (Figura 3.13).

El tratamiento sin remoción de hojarasca ni remoción de inóculo primario, mostró valores levemente más altos de crecimiento (Crec), defoliación total (Def) y defoliación de hojas enfermas (DefHE) (Cuadro 3.8). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para estas variables.

Todos los tratamientos presentan iguales coeficientes y probabilidades para las asociaciones analizadas, excepto para las correlaciones que contienen la variable cantidad total de geminíferos activos (G) las cuales se presentan en cuadro aparte (Cuadro 3.9 y Cuadro 3.10).



**Figura 3.12.** Progreso de la defoliación total para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.



**Figura 3.13.** Progreso de la defoliación de hojas enfermas en los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.



**Cuadro 3.8.** Área bajo la curva de desarrollo del crecimiento del hospedero (Crec), la defoliación total del hospedero (Def) y defoliación de hojas enfermas (DefHE), para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.

Tratamiento	ABCD		
	Crec	Def	DefHE
<b>ConH/ConIP</b>	827,35 <sup>a</sup>	252,96 <sup>a</sup>	56,04 <sup>a</sup>
<b>ConH/SinIP</b>	814,80 <sup>a</sup>	220,84 <sup>a</sup>	41,30 <sup>a</sup>
<b>SinH/ConIP</b>	823,66 <sup>a</sup>	229,38 <sup>a</sup>	46,87 <sup>a</sup>
<b>SinH/SinIP</b>	795,64 <sup>a</sup>	227,50 <sup>a</sup>	51,84 <sup>a</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acuerdo a la prueba LSD Fischer.

Todas las variables, menos cantidad total de geminíferos activos (G) y promedio de geminíferos activos por lesión (GL), correlacionan de manera significativa con las condiciones ambientales PREC (precipitación) y TEMP (temperatura); todas las variables están correlacionadas negativamente con TEMP (Cuadro 9).

Las variables cantidad total de hojas enfermas (HE), cantidad total lesiones (L) y cantidad total de geminíferos activos (G) correlacionan positiva y significativamente con la variable mojadura foliar (MF), las variables promedio de lesiones por hoja y promedio de geminíferos activos por lesión no correlacionan con esta variable (Cuadro 3.9).

Solo las variables cantidad total de geminíferos activos (G) y promedio de geminíferos activos por lesión (GL) correlacionan significativamente con la humedad relativa (HR) (Cuadro 3.9).

**Cuadro 3.9.** Coeficientes de correlación de Spearman para las variables evaluadas en el tratamiento ConH/ConIP (manejo tradicional) de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.

Asociaciones	$r_s$	Probabilidad ( $p$ )	Significancia
HE*HR	0,6571	0,1562	ns
HE*MF	0,8857	0,0188	**
HE*PREC	0,8857	0,0188	**
HE*TEMP	-0,8857	0,0188	**
L*HR	0,6571	0,1562	ns
L*MF	0,8857	0,0188	**
L*PREC	0,8857	0,0188	**
L*TEMP	-0,8857	0,0188	**
G*HR	0,9411	0,0051	***
G*MF	0,8804	0,0206	**
G*PREC	0,6983	0,1228	ns
G*TEMP	-0,6983	0,1228	ns
LH*HR	0,6000	0,2080	ns
LH*MF	0,7714	0,0724	ns
LH*PREC	0,9429	0,0048	***
LH*TEMP	-0,9429	0,0048	***
GL*HR	0,8452	0,0341	**
GL*MF	0,7775	0,0687	ns
GL*PREC	0,3719	0,4679	ns
GL*TEMP	-0,3719	0,4679	ns

ns: no estadísticamente significativo

\*\* : estadísticamente significativo si ( $p < 0,05$ )

\*\*\*: altamente significativo si ( $p < 0,01$ )

HE: cantidad total de hojas enfermas

L: cantidad total de lesiones

G: cantidad total de geminíferos activos

LH: promedio de lesiones por hoja

GL: promedio de geminíferos activos por lesión

HR: humedad relativa (%)

MF: mojadura foliar (horas)

PREC: precipitación (mm)

TEMP: temperatura (C)

**Cuadro 3.10.** Coeficientes de correlación de Spearman para las asociaciones de condiciones ambientales y total de geminíferos por tratamiento del experimento de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2013.

Asociaciones	Tratamiento							
	ConH/ConIP		ConH/SinIP		SinH/ConIP		SinH/SinIP	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
<b>G*HR</b>	0,9411	0,0051***	0,8452	0,0341**	0,8452	0,0341**	0,8804	0,0206**
<b>G*MF</b>	0,8804	0,0206**	0,7775	0,0687 <sup>ns</sup>	0,7775	0,0687 <sup>ns</sup>	0,9411	0,0051***
<b>G*PREC</b>	0,6983	0,1228 <sup>ns</sup>	0,3719	0,4679 <sup>ns</sup>	0,3719	0,4679 <sup>ns</sup>	0,7590	0,0801 <sup>ns</sup>
<b>G*TEMP</b>	-0,6983	0,1228 <sup>ns</sup>	-0,3719	0,4679 <sup>ns</sup>	-0,3719	0,4679 <sup>ns</sup>	-0,7590	0,0801 <sup>ns</sup>

ns : no estadísticamente significativo

\*\* : estadísticamente significativo si ( $p < 0,05$ )

\*\*\* : altamente significativo si ( $p < 0,01$ )

G: cantidad total de geminíferos activos

HR: humedad relativa (%)

MF: mojadura foliar (horas)

PREC: precipitación (mm)

TEMP: temperatura (C)

La variable cantidad total de geminíferos activos (G) correlaciona de forma significativa y positiva con la humedad relativa (HR) en todos los tratamientos evaluados. La significancia de la asociación es mayor en el tratamiento sin remoción de hojarasca ni remoción de inóculo inicial (Cuadro 3.10).

La variable cantidad total de geminíferos activos (G) correlaciona de forma significativa con la mojadura foliar (MF) solo en los tratamientos ConH/ConIP y SinH/SinIP. La significancia de la asociación es mayor en el tratamiento ConH/ConIP (Cuadro 3.10).

La variable cantidad total de geminíferos activos (G) no presenta correlación significativa con las variables climáticas PREC (precipitación) y TEMP (temperatura) (Cuadro 3.10).

## 2. Año epidemiológico 2014

Se presentó mayor diversidad de vegetación acompañante en los tratamientos ConH/ConIP y ConH/SinIP. La mayoría de la vegetación acompañante identificada es susceptible a *Mycena citricolor* (Cuadro 3.11).

**Cuadro 3.11.** Vegetación acompañante presente en las áreas de estudio donde se ubicó cada tratamiento del ensayo remoción de hojarasca y remoción de inóculo inicial. Zona de Los Santos, 2014.

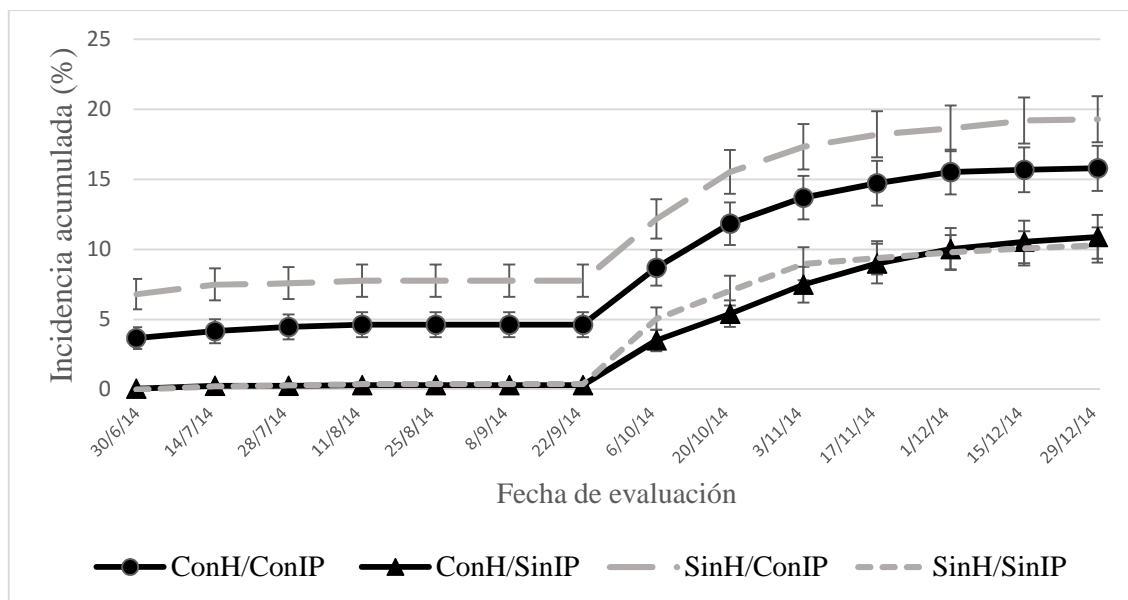
Tratamiento	Vegetación acompañante
<b>ConH/ConIP</b>	<i>Annona</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Anredera cordifolia</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Cissus verticillata</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Citharexylum donnell-smithii</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Commelina</i> <sup>(1)</sup> , <i>Dracaena</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Erythrina</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Ipomoea nil</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Iresine celosia</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Persea americana</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Phaseolus</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Catimor</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Helechos</i> <sup>(1,2)</sup>
<b>ConH/SinIP</b>	<i>Annona</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Anredera cordifolia</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Bryophyllum calycinum</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Cissus verticillata</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Erythrina</i> , <i>Iresine celosía</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Catimor</i> <sup>(1,2)</sup>
<b>SinH/ConIP</b>	<i>Cissus verticillata</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Dracaena</i> , <i>Erythrina</i> <sup>(1,2)</sup> ,
<b>SinH/SinIP</b>	<i>Cissus verticillata</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Dracaena</i> , <i>Erythrina</i> , <i>Ipomoea nil</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Ricinus communis</i> <sup>(1,2)</sup> , <i>Catimor</i>

<sup>(1)</sup>: presentaron síntomas de ojo de gallo, <sup>(2)</sup>: presentaron geminíferos de *Mycena citricolor*.

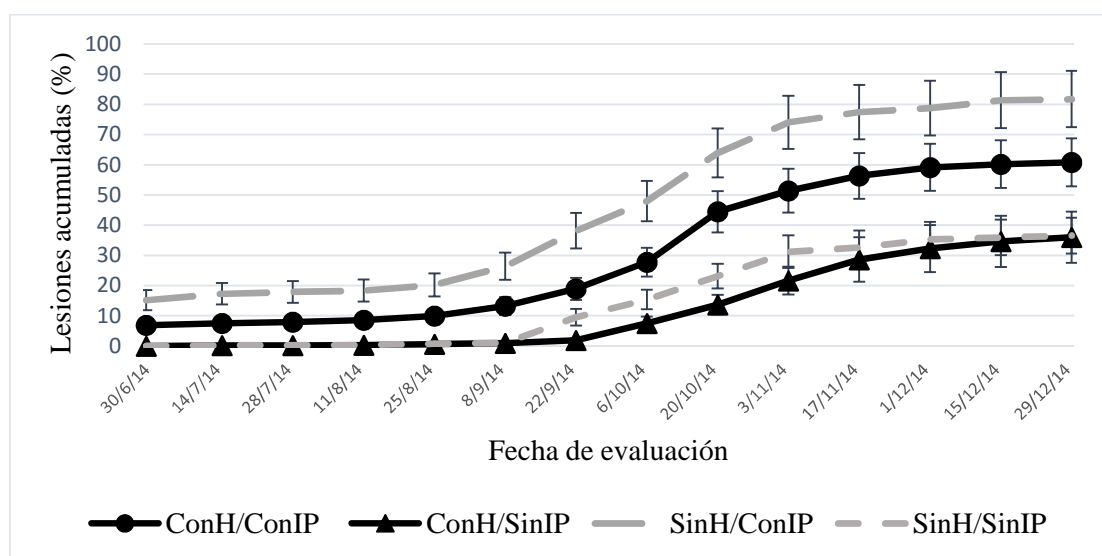
La incidencia de la enfermedad no superó el 20 % en el invierno 2014. Los tratamientos sin remoción de inóculo primario (SinH/ConIP y ConH/ConIP) fueron los que presentaron los valores más altos de incidencia acumulada, durante todas las evaluaciones, llegando a una enfermedad máxima de 19,30% en el tratamiento SinH/ConIP y de 15,79% en el ConH/ConIP. Los tratamientos de eliminación de inóculo, ConH/SinIP y SinH/SinIP, tuvieron máximos 10,90% y 10,30%, respectivamente (Figura 3.14).

El desarrollo de las lesiones, expresado por medio del descriptor D3 (porcentaje acumulado de lesiones en cada fecha de evaluación/cantidad de hojas acumuladas en la última evaluación) inició su incremento a inicios de setiembre en los tratamientos sin remoción de inóculo y presentó los menores valores en los tratamientos de eliminación de inóculo inicial (Figura 3.15).

Los tratamientos sin remoción de inóculo inicial (ConH/ConIP y SinH/ConIP) fueron los que registraron mayor cantidad de hojas enfermas, lesiones y geminíferos activos. Lo mismo ocurrió con los promedios de lesiones por hoja y geminíferos por lesión (Cuadro 3.12).



**Figura 3.14.** Desarrollo de la enfermedad expresada como incidencia acumulada (%) de ojo de gallo. Zona de Los Santos, 2014.



**Figura 3.15.** Desarrollo de la enfermedad expresada como lesiones acumuladas (%) de ojo de gallo. Zona de Los Santos, 2014.

El factor inóculo primario presentó diferencias entre los dos factores para las variables hojas enfermas ( $p=0,033$ ), lesiones ( $p= 0,029$ ) y geminíferos ( $p= 0,006$ ) pero no para el factor hojarasca con probabilidades de 0,939, 0,790 y 0,792, respectivamente (Anexo 2).

**Cuadro 3.12.** Hojas enfermas, lesiones, geminíferos activos totales, lesiones por hoja promedio y geminíferos por lesión promedio para todo el período de evaluación de los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.

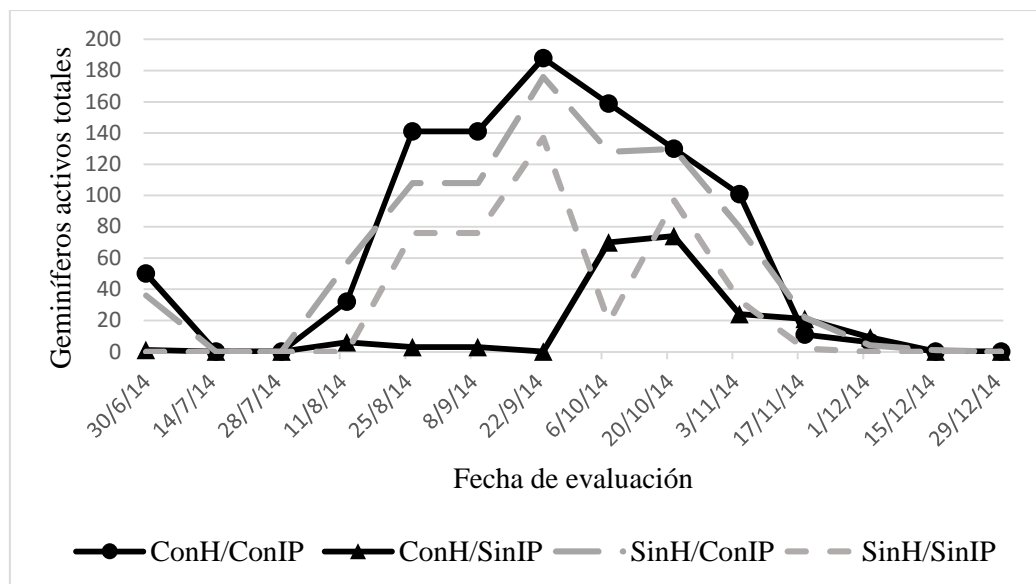
Tratamiento	Variable				
	Hojas enfermas	Lesiones	Geminíferos	Lesiones/hoja	Geminíferos/lesión
ConH/ConIP	279 <sup>ab</sup>	1051 <sup>ab</sup>	671 <sup>b</sup>	0,99±0,27 <sup>ab</sup>	0,32±0,25 <sup>a</sup>
ConH/SinIP	187 <sup>ab</sup>	625 <sup>a</sup>	188 <sup>a</sup>	0,39±0,12 <sup>a</sup>	0,07±0,06 <sup>a</sup>
SinH/ConIP	301 <sup>b</sup>	1233 <sup>b</sup>	602 <sup>b</sup>	1,60±0,37 <sup>b</sup>	0,29±0,12 <sup>a</sup>
SinH/SinIP	159 <sup>a</sup>	524 <sup>a</sup>	340 <sup>ab</sup>	0,65±0,24 <sup>a</sup>	0,14±0,09 <sup>a</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acuerdo a la prueba LSD Fischer.

**Cuadro 3.13.** Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad de acuerdo al porcentaje acumulado final de hojas enfermas (HED3), porcentaje acumulado final de lesiones (LD3) y porcentaje acumulado final de geminíferos activos (GD3), para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.

Tratamiento	ABCDE		
	HED3	LD3	GD3
ConH/ConIP	1642,44 <sup>ab</sup>	5595,79 <sup>ab</sup>	4075,71 <sup>ab</sup>
ConH/SinIP	745,00 <sup>a</sup>	2246,30 <sup>a</sup>	935,28 <sup>a</sup>
SinH/ConIP	2252,09 <sup>b</sup>	8565,84 <sup>b</sup>	3065,90 <sup>b</sup>
SinH/SinIP	806,48 <sup>ab</sup>	2859,89 <sup>ab</sup>	1550,66 <sup>ab</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acuerdo a la prueba LSD Fischer.

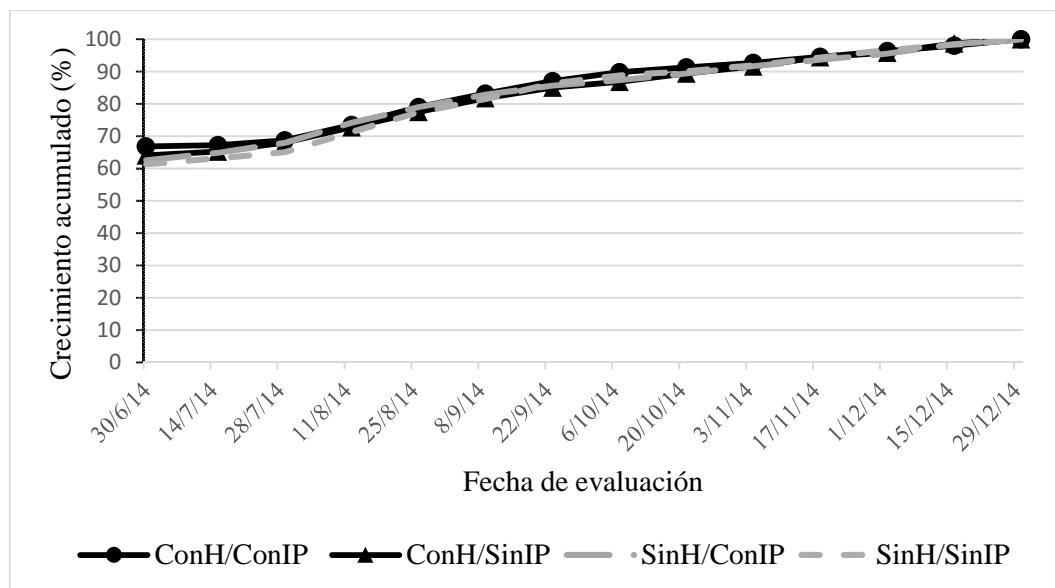


**Figura 3.16.** Curva de desarrollo de geminíferos activos de *Mycena citricolor* en los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario. Zona de Los Santos, 2014.

El tratamiento ConH/SinIP fue el que presentó el menor valor de área bajo la curva de desarrollo de hojas enfermas (HED3), lesiones (LD3) y geminíferos activos (GD3) (Cuadro 3.13). Las áreas bajo la curva de desarrollo de las tres variables difieren estadísticamente para el factor inóculo inicial, con probabilidades  $p=0,013$ ,  $p=0,011$  y  $p=0,006$ , respectivamente. Mientras que hay diferencia para el factor hojarasca,  $p=0,375$ ,  $p=0,310$  y  $p=0,590$ , en el mismo orden (Anexo 2).

El modelo de crecimiento logístico presentó los mayores coeficientes de determinación ( $R^2$ ) en todos los tratamientos, los cuadrados medios del error fueron menores en el modelo monomolecular para los tratamientos ConH/ConIP y SinH/ConIP. En los tratamientos ConH/SinIP y SinH/SinIP este parámetro fue igual para los modelos monomolecular y Gompertz (Cuadro 3.14).

La tasa absoluta ponderada de incremento de la enfermedad ( $\rho$ ) fue siempre menor para los modelos logístico y Gompertz en comparación al monomolecular para todos los tratamientos (Cuadro 3.14).



**Figura 3.17.** Progreso del crecimiento del hospedero para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.

Todos los tratamientos se comportan de forma muy similar en cuanto al crecimiento de las plantas (Figura 3.17). Los valores de áreas bajo la curva de desarrollo del crecimiento del hospedero no son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p=0,753$ )(Anexo 2).

El porcentaje acumulado de defoliación del hospedero presenta una curva ligeramente mayor en el tratamiento con remoción de hojarasca y sin eliminación de inóculo (Figura 3.18).

Los tratamientos sin remoción de inóculo inicial ConH/ConIP y SinH/ConIP presentaron mayor defoliación de hojas enfermas (Figura 3.19).



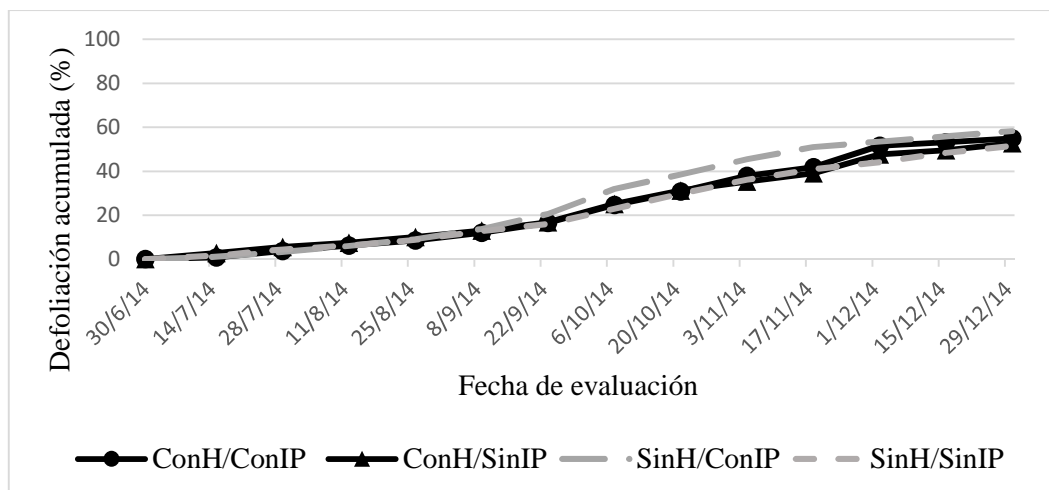
**Cuadro 3.14.** Resumen de los estadísticos del análisis de regresión lineal simple usados en la evaluación de la conveniencia de los modelo monomolecular, logístico y Gompertz para describir el progreso del ojo de gallo en cada tratamiento de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.

Tratamiento	Modelo	R <sup>2</sup> (%)	Cuadrado medio del error	Residuos Estandarizados	Ecuación de regresión	<i>p</i> <sup>(1)</sup>	<i>r</i> <sup>(2)</sup>	$\rho$ <sup>(3)</sup>
ConH/ConIP	Monomolecular	74,10	1,32	nda	y = 0,0319x - 1,1109	7,7322E-05	0,0319	0,0159
	Logístico	82,15	1,40	nda	y = 0,0415x - 2,7205	7,9375E-06	0,0415	0,0069
	Gompertz	78,23	1,36	nda	y = 0,0362x - 1,8302	2,6631E-05	0,0362	0,0090
ConH/SinIP	Monomolecular	65,40	1,28	nda	y = 0,0255x - 1,1644	0,00046216	0,0255	0,0127
	Logístico	89,56	1,33	nda	y = 0,0553x - 6,001	3,069E-07	0,0553	0,0092
	Gompertz	78,77	1,28	nda	y = 0,0357x - 2,8672	2,2855E-05	0,0357	0,0089
SinH/ConIP	Monomolecular	73,29	1,27	nda	y = 0,0306x - 0,875	9,3339E-05	0,0306	0,0153
	Logístico	79,71	1,34	nda	y = 0,0375x - 2,0469	1,7317E-05	0,0375	0,0062
	Gompertz	76,59	1,30	nda	y = 0,0338x - 1,4153	4,1548E-05	0,0338	0,0084
SinH/SinIP	Monomolecular	74,69	1,04	nda	y = 0,0286x - 1,2199	6,7124E-05	0,0286	0,0143
	Logístico	91,82	1,13	nda	y = 0,0584x - 5,8964	7,0248E-08	0,0584	0,0097
	Gompertz	84,49	1,04	nda	y = 0,0389x - 2,8762	3,3671E-06	0,0389	0,0097

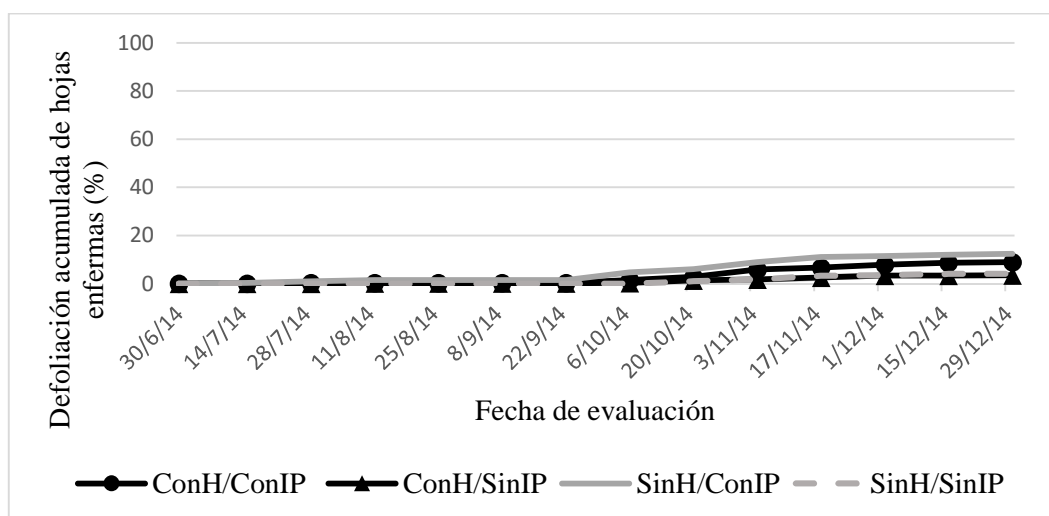
nda: no hay dispersión aleatoria alrededor de la línea de predicción al graficar los residuos estandarizados contra los valores de enfermedad predichos.

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación (suma de cuadrados del error/cuadrado medio del error), <sup>(1)</sup>: probabilidad de la regresión, <sup>(2)</sup>: tasa de infección aparente,

<sup>(3)</sup>:parámetro Rho (tasa absoluta ponderada de incremento de la enfermedad) para comparación entre tasas de infección aparente de los diferentes modelos.



**Figura 3.18.** Progreso de la defoliación total para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.



**Figura 3.19.** Progreso de la defoliación de hojas enfermas en los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.

Las áreas bajo la curva de desarrollo de la defoliación total del hospedero son muy similares entre tratamientos y no difieren estadísticamente (Cuadro 3.15).

El área bajo la curva de desarrollo de la defoliación de hojas enfermas fue mayor para los tratamientos sin remoción de inóculo inicial, ConH/ConIP y SinH/ConIP, con valores de 74,38 y 44,36, respectivamente (Cuadro 3.15). Existe diferencia significativa entre inóculo inicial ( $p=0,002$ ) (Anexo 2).

Todos los tratamientos presentan iguales coeficientes y probabilidades para las asociaciones analizadas que contienen las variables cantidad total de hojas enfermas (HE), cantidad total de lesiones (L) y promedio de lesiones por hoja (LH) (Cuadro 3.16).

Solo algunas asociaciones con la variable geminíferos (G y GL) presentan correlaciones significativas (Cuadro 3.16).

**Cuadro 3.15.** Área bajo la curva de desarrollo del crecimiento del hospedero (Crec), la defoliación total del hospedero (Def) y la defoliación de hojas enfermas (DefHE), para los tratamientos de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.

Tratamiento	ABCD		
	Crec	Def	DefHE
<b>ConH/ConIP</b>	1188,64 <sup>a</sup>	342,27 <sup>a</sup>	44,36 <sup>ab</sup>
<b>ConH/SinIP</b>	1171,84 <sup>a</sup>	336,34 <sup>a</sup>	17,36 <sup>a</sup>
<b>SinH/ConIP</b>	1174,27 <sup>a</sup>	389,10 <sup>a</sup>	74,38 <sup>b</sup>
<b>SinH/SinIP</b>	1167,40 <sup>a</sup>	324,44 <sup>a</sup>	18,52 <sup>a</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acuerdo a la prueba LSD Fischer.

Para las correlaciones que contienen la variable cantidad total de geminíferos (G) y promedio de geminíferos por lesión (GL) se presentaron los valores de  $r_s$  y sus probabilidades, según tratamiento. Las asociaciones de cantidad total de geminíferos (G) con las variables ambientales humedad relativa (HR), precipitación (PREC) y temperatura (TEMP) son significativas en todos los tratamientos. La cantidad de geminíferos activos (G) correlaciona negativamente con la temperatura en todos los tratamientos (Cuadro 3.17).

La variable promedio de geminíferos por lesión (GL) correlaciona significativamente con tres de los cuatro tratamientos (ConH/ConIP, SinH/ConIP y SinH/SinIP) para su asociación con las variables humedad relativa (HR) y temperatura (TEMP) (Cuadro 3.17).

**Cuadro 3.16.** Coeficientes de correlación de Spearman para las variables evaluadas en el tratamiento ConH/ConIP de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.

Asociaciones	$r_s$	Probabilidad( $p$ )	Significancia
HE*HR	-0,1261	0,1726	ns
HE*MF	0,5797	0,7876	ns
HE*PREC	-0,2523	0,5852	ns
HE*TEMP	-0,0901	0,8477	ns
L*HR	0,2500	0,5887	ns
L*MF	0,7042	0,0774	ns
L*PREC	0,000	1,000	ns
L*TEMP	-0,4643	0,2939	ns
G*HR	0,9286	0,0025	***
G*MF	0,4077	0,3639	ns
G*PREC	0,8571	0,0137	**
G*TEMP	-0,8929	0,0068	***
LH*HR	0,2500	0,5887	ns
LH*MF	0,7042	0,0774	ns
LH*PREC	0,000	1,000	ns
LH*TEMP	-0,4643	0,2939	ns
GL*HR	0,7857	0,0362	**
GL*MF	0,559	0,1950	ns
GL*PREC	0,5357	0,2152	ns
GL*TEMP	-0,8571	0,0137	**

ns: no estadísticamente significativo

\*\* : estadísticamente significativo si ( $p < 0,05$ )

\*\*\*: altamente significativo si ( $p < 0,01$ )

HE: cantidad total de hojas enfermas

L: cantidad total de lesiones

G: cantidad total de geminíferos activos

LH: promedio de lesiones por hoja

GL: promedio de geminíferos activos por lesión

HR: humedad relativa (%)

MF: mojadura foliar (horas)

PREC: precipitación (mm)

TEMP: temperatura (C)

**Cuadro 3.17.** Coeficientes de correlación de Spearman para las asociaciones de condiciones ambientales con total de geminíferos y geminíferos por lesión por tratamiento del experimento de remoción de hojarasca e inóculo primario, Zona de Los Santos, 2014.

Asociaciones	Tratamiento							
	ConH/ConIP		ConH/SinIP		SinH/ConIP		SinH/SinIP	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
<b>G*HR</b>	0,9286	0,0025***	0,9286	0,0025***	0,9643	0,0005***	0,9643	0,0005***
<b>G*MF</b>	0,4077	0,3639 <sup>ns</sup>	0,4077	0,3639 <sup>ns</sup>	0,2965	0,5185 <sup>ns</sup>	0,2965	0,5185 <sup>ns</sup>
<b>G*PREC</b>	0,8571	0,0137**	0,8571	0,0137**	0,8929	0,0068***	0,8929	0,0068***
<b>G*TEMP</b>	-0,8929	0,0068***	-0,8929	0,0068***	-0,9286	0,0025***	-0,9286	0,0025***
<b>GL*HR</b>	0,7857	0,0362**	0,6071	0,1482 <sup>ns</sup>	0,8571	0,0137**	0,8571	0,0137**
<b>GL*TEMP</b>	-0,8571	0,0137**	-0,7143	0,0713 <sup>ns</sup>	-0,9286	0,0025**	-0,9286	0,0025***

ns : no estadísticamente significativo

\*\* : estadísticamente significativo si ( $p < 0.05$ )

\*\*\* : altamente significativo si ( $p < 0.01$ )

G: cantidad total de geminíferos activos

GL: promedio de geminíferos activos por lesión

HR: humedad relativa (%)

MF: mojadura foliar (horas)

PREC: precipitación (mm)

TEMP: temperatura (C)

## Discusión

En términos generales las plantas y árboles presentes en las parcelas experimentales del ensayo para el 2013 exhibieron características muy similares, aunque en las áreas donde se ubicó el tratamiento ConH/SinIP se registró un promedio mayor de cantidad de árboles y altura de plantas.

La enfermedad no superó el 25% de incidencia en ninguno de los años de estudio, debido probablemente, a que las condiciones ambientales fueron atípicas para la zona en esos años y no conducentes para la enfermedad.

La zona de Los Santos es considerada como una región lluviosa y mesotermal, por estar ubicada entre los 800 y 2 000 msnm, presentar un total de lluvia anual entre 2 000 y 4 000 mm y una temperatura media anual entre 10 a 22°C (Solano y Villalobos, sf). Sin embargo, durante los años de estudio, la precipitación anual acumulada no superó el mínimo para una

zona lluviosa; sobre todo en el año 2013 que contabilizó 500 mm de lluvia menos que el mínimo para la zona. Las temperaturas mínimas registradas estuvieron hasta 6°C por encima del mínimo normal para esta región (Cuadro 3.1 y Figuras 3.6 y 3.7), condiciones que fueron suficientes para el desarrollo de la roya y menos favorables para el ojo de gallo.

De hecho, para el establecimiento del ensayo del segundo año no fue posible usar las fincas FI y G7 debido a que las parcelas experimentales fueron podadas a profundidad por mostrar severa defoliación a causa de la roya, lo que confirma la idea de que las condiciones ambientales afectaron fuertemente la dinámica de la enfermedad.

Las epidemias desarrolladas bajo cada tratamiento se comportaron diferente en cada año de estudio, así en el 2013 no se observa efecto ni de la remoción de hojarasca ni del inóculo primario ya que los tratamientos que produjeron mayores incidencias fueron los tratamientos que combinaron los niveles extremos de ambos factores; es decir, con remoción de hojarasca e inóculo (SinH/SinIP) con un 25% y sin remoción de hojarasca ni de inóculo (ConH/ConIP) con un 23% (Figura 3.8), se debe acotar que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna variable para ningún factor.

En cambio, para el progreso de la enfermedad en el año 2014 (Figura 3.14) sí es posible apreciar el impacto del inóculo inicial con claridad, ya que fueron los tratamientos que mantuvieron el inóculo primario (ConH/ConIP y SinH/ConIP) los que alcanzaron los mayores porcentajes de incidencia, 15,79 y 19,30, respectivamente y se declaró diferencia estadística significativa para el factor inóculo inicial.

En la epidemia del 2013 se observa una posible relación entre la condición del hospedero y el desarrollo de la enfermedad, ya que el tratamiento SinH/SinIP presentó los mayores niveles de enfermedad y mayor cantidad de lesiones y fue el que exhibió la curva de crecimiento acumulado más baja de todas, desde el inicio del período, lo que podría estar indicando alguna tendencia biológica, sin embargo, no se halló diferencia estadística significativa.

Se puede notar este efecto al comparar las curvas de desarrollo de la enfermedad expresadas como incidencia (hojas enfermas) con la de lesiones (descriptor de la severidad), expuestas en las Figuras 3.8 y 3.9, en el período comprendido entre el 15 y el 29 de octubre, en las que se muestra como el tratamiento ConH/ConIP aunque presentó mayor incidencia que el

tratamiento SinH/ConIP, contabilizó menor cantidad de lesiones, es decir un valor promedio menor de lesiones por hoja enferma. Así mismo, el progreso de los geminíferos presentes y el dato de porcentaje de lesiones con geminíferos, dejan ver que las lesiones producidas en las hojas bajo los tratamientos de eliminación de hojarasca, tuvieron mayor capacidad para producir propágulos, quizá al estar las plantas estresadas el patógeno pudo expresar su agresividad en mayor grado. Sin embargo, no se cuenta con evidencia estadística que lo respalde.

Es de importancia hacer notar que, en ese período se registraron los mayores valores de precipitación y mojadura foliar para la zona en estudio, lo que influyó en la cantidad de lesiones formadas, ya que se encontró una correlación positiva y significativa de 88% para la asociación de esas variables en ese año de estudio (Cuadro 3.9).

Comportamiento que concuerda con lo dicho por varios investigadores, los que indican que el desarrollo de la epidemia depende de la fluctuación estacional de la lluvia y la humedad relativa, sobretodo de que la humedad se mantenga superior al 80%. Indican que una vez que las lluvias empiezan, el número de hojas enfermas y el número de lesiones por hoja aumentan rápidamente. Mencionan que en Costa Rica, la máxima infección se presenta entre setiembre y octubre, que son los meses de mayor precipitación y empieza a reducir en diciembre; durante estos meses se deben acumular 400 mm de lluvia en tres semanas consecutivas para que se presente la enfermedad (Wellman 1950, Bonilla 1980, PROMECAFE 1990, Ramírez 1994, Wang y Avelino 1999, Porras 2000, Guerra 2004, Vargas 2004, Barquero 2007, Barquero 2012).

Independientemente de que hubo tratamientos que mostraron (biológica pero no estadísticamente) diferencias en la cantidad de enfermedad, expresada como incidencia o área bajo la curva, las epidemias se ajustaron con más de un 70%<sup>13</sup> de explicación ( $R^2$ ) al modelo de crecimiento logístico; con tasas de infección aparente ( $r$ ) prácticamente iguales, de 0,0440; 0,0437; 0,0452 y 0,0484 unidades/día, para los tratamientos ConH/ConIP, ConH/SinIP, SinH/ConIP y SinH/SinIP, respectivamente (Cuadro 3.7). Indicando que no

---

<sup>13</sup> De acuerdo a Campbell y Madden (1990), en ensayos realizados bajo condiciones de campo coeficientes de determinación ( $R^2$ ) superiores a 60% son considerados como excelentes.

hubo efecto de la cantidad de inóculo inicial ni de la presencia o no de hojarasca en las epidemias del 2013 sobre la velocidad de desarrollo de la enfermedad.

La tasa de infección aparente hallada en esta investigación es mayor a las reportadas por Wang y Arauz (1999) de 0,015 unidades/día y por Vargas (2004) de 0,004 unidades/día, aunque sigue siendo baja para una enfermedad de tipo policíclica.

Este valor ( $r$ ) significa un aumento en la cantidad de inóculo o de enfermedad (incidencia o severidad), puede ser calculado por días, semanas o años. En general, el valor de  $r$  para las enfermedades de ciclo múltiple es mucho más grande que la  $r$  ( $r_m$ ) de enfermedades monocíclicas (Agrios 2005). Puede ser considerado como una medida del riesgo de una enfermedad y es uno de los tres parámetros epidemiológicos claves para desarrollar estrategias de manejo; los otros son la cantidad de inóculo inicial ( $y_0$ ) y el tiempo ( $t$ ) en que el patógeno y el hospedero interactúan. El valor de  $r$  en enfermedades de varios ciclos es el que tiene mayor importancia para establecer pautas de manejo que logren reducir la enfermedad de manera agroecológica y económicamente sostenible (Nutter 2007).

Si se cotejan los valores de  $r$  típicos para enfermedades policíclicas con los valores reportados previamente y en esta investigación, podría decirse que el ojo de gallo se comporta más como una enfermedad de tipo monocíclica.

El desarrollo de una enfermedad policíclica típica tiende a ser exponencial y depende de la cantidad de tejido enfermo y de tejido remanente por infectar en todo momento, más que de la cantidad de inóculo primario o inicial, por lo que reducciones del inóculo no afectan de forma significativa el desarrollo de la epidemia. Por ejemplo, para enfermedades con valores para  $r$  de 0,1 (similar al de la roya anaranjada) la disminución del 50% del inóculo inicial solo representa un retraso de 7 días. Conforme aumenta el valor de  $r$  se hace menos importante la reducción del inóculo a partir de su fuente inicial, por ejemplo en epidemias con valores de  $r$  de 0,6 aunque se disminuya el inóculo inicial en un 95% la enfermedad se retrasa en solamente 5 días (Arauz 1998, Nutter 2007).

De acuerdo a Arauz (1998) y Nutter (2007) la influencia del inóculo primario puede variar en las enfermedades de ciclo múltiple en relación al valor de  $r$ ; de esta forma el nivel de inóculo es importante si la  $r$  es baja, como en el caso del ojo de gallo; se supone que cuando



$r$  es baja el desarrollo de la epidemia disminuye significativamente al reducir la cantidad de inóculo inicial; así, para una enfermedad con  $r$  de 0,02 se puede retrasar la epidemia 11 días si se logra disminuir el inóculo inicial en 20%, puede retrasarse 35 días con una reducción de inóculo (a partir de la fuente) de un 50% y hasta 80 días con reducción del 80%. Sin embargo con los datos hallados en las epidemias del 2013 no se logró el efecto de disminución de enfermedad al eliminar el inóculo primario por completo. Es difícil determinar las posibles causas de este comportamiento, pues casi todos los factores bióticos y abióticos pueden influenciar la tasa de infección aparente.

Al respecto Campbell y Madden 1990, Achicanoy 2000 y Agrios 2005, indican que este parámetro está determinado por la susceptibilidad del hospedero, la agresividad del patógeno y las condiciones ambientales, se podría especular que (como se discutió antes) exista un efecto importante de la condición del hospedero sobre el desarrollo de la enfermedad o bien, que la mayor fuente de inóculo primario para el ojo de gallo no esté constituido por las lesiones presentes en la planta al inicio de la estación lluviosa, sino por inóculo que se encuentra en otras fuentes, como hospederos alternos.

Aunque, Wang y Avelino (1999) señalan que existe una correlación positiva entre el inóculo residual, medido como porcentaje de hojas viejas con lesiones (hojas nacidas en el año "n-1") observadas en el año "n" y el porcentaje de lesiones capaces de producir cabecitas, observadas en el mes de junio del año "n" y que se observa un adelanto en el desarrollo de la epidemia en los cafetales que presentan mayor cantidad de inoculo residual.

Sin embargo, se debe tener precaución en las interpretaciones de estos resultados, al menos en dos vías; primero, una correlación positiva no indica una asociación de causa y efecto de las variables asociadas, si no, que existe una tendencia de aumento de una cuando aumenta la otra, este comportamiento puede ocurrir sin necesidad de causalidad.

Segundo, se menciona el número de hojas viejas con lesiones como fuente de inóculo residual, pero no se aclara la edad de las lesiones, que es lo realmente importante, ya que en el campo pueden haber hojas del año anterior (n-1) con lesiones del año presente (n) debidas a infecciones nuevas provocadas por inóculo secundario de los primeros ciclos producidos, ya que se menciona que la observación se realizó en junio, momento en el cual ya se han

presentado condiciones conducentes y se han dado al menos dos ciclos de producción de inóculo en las hojas infectadas, ya que se requieren entre 11 y 15 días para completar un período de latencia.

Además, el inóculo puede provenir de otras fuentes diferentes al café, como arvenses o árboles de sombra infectados con *Mycena citricolor* como se determinó en pruebas paralelas<sup>14</sup>.

Caso contrario ocurrió con las epidemias desarrolladas en el año 2014, en las que se nota claramente el impacto de la eliminación del inóculo como factor determinante en el desarrollo de la enfermedad; y en segundo plano se nota un efecto de la remoción de hojarasca de las parcelas.

De igual forma que para las epidemias del 2013, se puede teorizar que la eliminación de la hojarasca produce efectos detrimentales sobre el cultivo, ya que si bien es cierto, los tratamientos sin remoción de inóculo (aunque se eliminara la hojarasca) presentan valores más altos en todos los descriptores de enfermedad; si se suman las áreas bajo las curvas de los tratamientos solo tomando en cuenta el factor hojarasca se nota que los valores son mucho más elevados para las parcelas sin hojarasca que para las parcelas con hojarasca (Cuadro 3.13), es decir, la remoción de la capa orgánica podría estar predisponiendo a las plantas a enfermarse y las que se enferman más son las que permanecen con el inóculo primario. Se observa la misma tendencia en la variable lesiones por hoja (Cuadro 3.12), insinuando que las plantas bajo los tratamientos sin hojarasca presentan un sistema de defensa disminuido, es decir, se encuentran en condiciones estresantes, que permiten que se desarrollen más lesiones en la misma hoja.

La forma de las curvas de desarrollo de la enfermedad para el año 2014 se asemejan en gran medida a la curva obtenida por Vargas *et al.* (1990), con nivel de enfermedad inicial ( $y_0$ ) bajo, estos investigadores encontraron disminución en el desarrollo de la enfermedad en una epidemia de ojo de gallo evaluada en 1985 en condiciones de enfermedad inicial menor del 10%, en comparación con  $y_0$  superior al 70%.

---

<sup>14</sup> Ver detalles en el Capítulo 2. Fuentes y patogenicidad del inóculo primario de ojo de gallo.

Para esos investigadores, la curva de la enfermedad con mayor nivel inicial se mantuvo por encima del 80% durante todo el período lluvioso, mientras que el desarrollo de la enfermedad con menor  $y_0$  exhibió una enfermedad mucho menor durante todo el período, para los meses de junio, julio y agosto se notó una diferencia del 60% entre una curva y otra; a partir de setiembre la diferencia entre ambas enfermedades bajó al 30%, manteniéndose siempre más enfermas las plantas que iniciaron con mayor enfermedad, al final del invierno la diferencia se redujo a un valor aproximado del 5%. Sus resultados confirman la importancia de  $y_0$  en enfermedades policíclicas con tasa de infección baja.

En esta investigación la diferencia entre enfermedad inicial en tratamientos con y sin eliminación de inóculo primario fue solamente del 7% como máximo, lo que no permitió cuantificar marcadas diferencias en el desarrollo de la enfermedad con la reducción de  $y_0$ , como las encontradas por Vargas *et al.* (1990).

Las condiciones atípicas de temperatura y precipitación que se desarrollaron en los años de estudio, afectaron notoriamente el desarrollo de las epidemias, se nota como en el 2013 en el que se presentó mayor déficit de lluvia no fue posible encontrar efecto de  $y_0$ ; mientras que sí fue posible observar diferencias bajo las condiciones de estudio del 2014, año en el que se registraron 500 mm de lluvia más que el año anterior, lo que permitió un mejor desarrollo del ojo de gallo en la zona. El comportamiento del acumulado de lesiones siguió la misma forma que las curvas de incidencia acumulada, sugiriendo una estrecha relación entre ambas variables.

El desarrollo de las epidemias en el 2014 se ajusta, al igual que en el 2013, al modelo de crecimiento logístico, el cual presenta los mayores valores de  $R^2$  en relación a los modelos de crecimiento monomolecular y Gompertz (Cuadro 3.14). El tratamiento SinH/ConIP presenta la tasa de infección más baja  $r=0,0375$ ; el tratamiento testigo (ConH/ConIP) presenta una tasa similar ( $r=0,0415$ ) a las calculadas para las epidemias del 2013; mientras que los tratamientos 1,2 y 2,2 presentaron tasas de infección aparente levemente más altas,  $r=0,0553$  y  $r=0,0584$  respectivamente (Cuadro 3.7 y Cuadro 3.14).

Quizá exista un efecto sobre la tasa de incremento de la enfermedad en las parcelas donde se remueve la capa orgánica y las hojas, debido a la hipótesis de predisposición discutida antes;

sin embargo, la  $r$  para el tratamiento ConH/SinIP en términos prácticos es igual a la del tratamiento de remoción de la capa orgánica; además, la tasa de infección del tratamiento en el que también se elimina la hojarasca pero se mantiene el inóculo (SinH/ConIP) es el que presenta la menor  $r$ , todo lo anterior le resta fuerza a la hipótesis (Cuadro 3.14), y lleva a la misma conclusión del año 2013, de que es difícil determinar las posibles causas en el comportamiento de la tasa de infección aparente, pues casi todos los factores bióticos y abióticos pueden influenciarla.

Es importante hacer notar que aunque haya lesiones presentes no significa que hay ciclos nuevos de infección, ya que del total de lesiones contabilizadas en el año 2013, solamente el 35% produjo geminíferos activos, situación que puede estar explicando la baja tasa de desarrollo de la enfermedad. No obstante, para el tratamiento SinH/SinIP se nota una correspondencia entre el aumento en la cantidad de geminíferos y el aumento en la cantidad de lesiones, posiblemente indicando que muchos de los geminíferos activos que se registraron en la evaluación del 15 de octubre fueron capaces de infectar tejido sano y de producir lesiones nuevas, ya que es a partir de ese punto en que se separa la curva de lesiones del tratamiento mencionado. Algo similar ocurrió en el tratamiento SinH/ConIP, pero con menor intensidad (Figuras 3.9 y 3.10).

Para el año 2014, no se nota una relación tan marcada entre cantidad de geminíferos y desarrollo de nuevas lesiones; pero sí se observa con claridad que la curva sigue una distribución normal, y que se presentan las mayores densidades en los meses de mayor precipitación (Figura 3.7 y Figura 3.16). Los tratamientos que produjeron más lesiones tenían más propágulos, siendo que el tratamiento testigo (ConH/ConIP) fue el que produjo la mayor cantidad (Figura 3.15 y Figura 3.16). La producción de geminíferos pudo haber sido afectada por la presencia de arvenses en esas parcelas, en las que hubo mayor cantidad y diversidad (Cuadro 3.11), lo que pudo promover mayores porcentajes de humedad relativa en esas parcelas favoreciendo la producción de mayor cantidad de geminíferos. Además, existe la posibilidad de que geminíferos provenientes de las arvenses o árboles de sombra infectados con *M. citricolor* produjeran lesiones en las plantas en estas parcelas y por lo tanto se registraran mayor cantidad de geminíferos, ya que se comprobó<sup>15</sup> que el inóculo proveniente

---

<sup>15</sup> Ver detalles en el Capítulo 2. Fuentes y patogenicidad del inóculo primario de ojo de gallo.

de cepas del patógeno proveniente de fuentes diferentes al cafeto tiene mayores índices de patogenicidad.

Al revisar las asociaciones de descriptores de la enfermedad con las condiciones ambientales se nota que, la cantidad total de geminíferos (G) y el promedio de geminíferos por lesión (GL) correlacionan positiva y significativamente con la humedad relativa,  $R^2=0,94$  y  $R^2=0,84$ , respectivamente, así como con la cantidad de horas de mojadura foliar para la primera variable ( $R^2=0,88$ ). Además, las variable G y PREC (precipitación) presentan un  $R^2=0,69$  (Cuadros 3.9 y 3.10). De acuerdo a esto, muy probablemente las variables ambientales mencionadas estén determinando la aparición de geminíferos en las lesiones. Esto se confirma con los resultados obtenidos por Vargas (2004) quien desarrolló una ecuación de predicción con 5 días de anticipación para la variable “lesiones esporuladas”<sup>16</sup> a partir de los valores de humedad relativa y mojadura foliar, de esta forma con un  $R^2=0,67$  estableció la ecuación  $y=0,334-0,224*MF+0,002(HR*MF)$  que explica la variación de lesiones con estructuras de ojo de gallo. Este comportamiento se ajusta a lo mencionado por Staver *et al.* (2001), quienes indican que enfermedades producidas por *M. citricolor*, *Phoma costarricensis* y *Pellicularia koleroga* se corelacionan positiva y uniformemente con la humedad.

Por otro lado, el crecimiento del hospedero para el año 2014 se presentó prácticamente igual en todos los tratamientos evaluados (Figura 3.17), lo que presume que no hubo ningún efecto sobre el desarrollo de la enfermedad debida a condiciones propias de la planta y que los efectos se deben a los tratamientos aplicados.

Con respecto a la defoliación total, es decir la sumatoria de la caída de hojas enfermas y sanas, o al menos sin enfermedad aparente, se mantuvo muy similar para todos los tratamientos en el año 2013. Aunque, en el tratamiento testigo se presentó una curva ligeramente mayor, a partir de la evaluación de inicios de setiembre y hasta el final de las evaluaciones. El tratamiento SinH/ConIP, con mantenimiento de inóculo pero remoción de hojarasca, se separa ligeramente de los tratamientos a los que se les eliminaron las hojas

---

<sup>16</sup> El hongo *Mycena citricolor* no produce conidios ni esporas en su fase anamórfica, la cual produce los síntomas típicos de ojo de gallo en café, por lo que el término “lesiones esporuladas” se refiere en realidad a lesiones con presencia de geminíferos.

enfermas (ConH/SinIP y SinH/SinIP) a finales de octubre, sugiriendo un efecto del inóculo primario sobre la defoliación del hospedero y corroborado por la magnitud del descriptor DEH para el tratamiento testigo, el cual es mayor, aunque no estadísticamente diferente al valor de los demás tratamientos (Cuadro 3.8).

Se observa un efecto similar en 2014, el tratamiento SinH/ConIP se separa de los otros tratamientos a inicios de las lluvias, aunque el tratamiento ConH/ConIP es el que acumula más defoliación total (Cuadro 3.8 y Figura 3.18). La defoliación de hojas con ojo de gallo se comportó de manera muy similar a la incidencia, proponiendo que las plantas que mantienen su inóculo inicial están más propensas a eliminar las hojas enfermas durante el ciclo de la enfermedad (Figura 3.19).

En síntesis, el desarrollo de la epidemia en años con condiciones ambientales atípicas parece estar más influenciado por estas que por el nivel de inóculo primario. De esta forma aunque en ninguno de los años de estudio se dieron las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad, ni se cumplió con al menos 400mm de lluvia en tres semanas consecutivas, fue en el 2014 que se logró notar un efecto del inóculo primario sobre la epidemia, ya que se registraron valores más elevados de precipitación anual (1 996mm en 2014 contra 1 527mm en 2013) y más cercanos al valor de lluvia acumulada (327mm versus 282mm) en los meses de setiembre y octubre.

Por otro lado, parece que el efecto de la remoción de la capa orgánica sobre la enfermedad está más relacionado al impacto en el vigor de la planta que a la cantidad de inóculo que pueda existir en la hojarasca; ya que bajo el supuesto de que *M. citricolor* tiene un hábito de vida saprófito y descomponedor de hojarasca, se debió encontrar diferencias relevantes en los niveles de enfermedad en los tratamientos de remoción de hojarasca; sin embargo en los dos años de estudio fueron los tratamientos sin hojarasca los que desarrollaron mayor enfermedad en términos absolutos. Lo que sugiere que la hojarasca no tiene un rol importante como fuente de inóculo del ojo de gallo.

## **Conclusiones**

1. La hojarasca presente en el piso del cafetal no es una fuente de inóculo primario para el ojo de gallo.
2. La eliminación de la hojarasca se relaciona con mayores valores absolutos de la enfermedad.
3. El inóculo primario tiene efecto sobre el desarrollo del ojo de gallo bajo condiciones conducentes para la enfermedad.
4. A mayores niveles de inóculo primario mayores niveles de enfermedad final bajo condiciones conducentes para la enfermedad.

## **Recomendaciones**

1. No se recomienda ni la remoción de hojarasca ni de hojas enfermas ya que se podría retardar el crecimiento de la planta y la predisponer a la enfermedad.
2. Eliminar el inóculo primario presente en la plantación en hospederos distintos al cafeto.

## Literatura citada

- Achicanoy, H. 2000. Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. Vol.53 (1): 941-968.
- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5ed. Elsevier Academic Press. 948p
- Arauz, LF. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. p. 265-280.
- Albertin, A; Nair, PKR. 2004. Farmers' Perspectives on the Role of Shade Trees in Coffee Production Systems: An Assessment from the Nicoya Peninsula, Costa Rica. Human Ecology Vol. 32 (4): 443-463.
- Avelino, J. Toledo, J. Medina, B. 1995. Desarrollo del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en una finca del norte de Guatemala y evaluación de los daños provocados por esta enfermedad. XVI Simposio de Caficultura Latinoamericana. Managua, Nicaragua. 25-29 de octubre 1993.
- \_\_\_\_\_. Muller, R. Eskes, A. Santacreo, R. Holguín, F. 1999. La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. In: Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. IICA, San José, Costa Rica. p. 193-242.
- \_\_\_\_\_. Cabut, S. Barboza, B; Barquero, M; Alfaro, R; Esquivel, C; Durand, JF; Cilas, C. 2007. Topography and crop management are key factors for the development of american leaf spot epidemics on coffee in Costa Rica. Phytopathology 97: 1532-1542.
- Barquero, M. 2007. Algunas consideraciones sobre el ojo de gallo. Revista Informativa del Icafé. I-2007: 11-15.
- Barquero M. 2012. Sistema de alerta temprana para el ojo de gallo. Revista informativa. Número 2 Año 6. ICAFE. p 2-4.
- Beer, J; Muschler, R; Kass, D; Somarriba, E. 1998. Shade management in coffee and cacao plantations. Agroforestry Systems 38: 139-164.
- Bonilla, GJ. 1980. Estudio del ojo de gallo causado por el hongo *Mycena citricolor*. III Simposio Latinoamericano sobre caficultura, Honduras, IICA. p. 177-188.
- Buller R, 1958. *Omphalia flavida*, a gemmiferous and luminous leaf-spot fungus. In: Researches on fungi. London. New York. Vol.6: 397-442.
- Campbell, C; Madden, L. 1990. Introduction of plant disease epidemiology. Wiley-Interscience Publication. p. 161-210.
- Cannon, PF; Kirk, PM. 2007. Fungal families of the world. CABI. 456 p.
- Carvajal F. 1939a. Ojo de gallo (*Omphalia flavida*). Revista del Instituto de Defensa del Café de Costa Rica. Tomo 7. No.52. p. 535-549.



- Carvajal, F. 1939b. Ojo de gallo (*Omphalia flavida*): Segunda parte, la forma perfecta del hongo "*Omphalia flavida*" creciendo libremente en la naturaleza como parásito sobre plantas vivas, en el distrito cafetalero del Zapote (Prov. de San José, CR). Revista del Instituto de Defensa del Café de Costa Rica. Tomo 7. No.52. p. 550-565.
- CENICAFE. s.f. Enfermedades y disturbios del café (en línea). Consultado 24 abr. 2011. Disponible en [http://www.cenicafe.org/modules.php?name=Enfermedades\\_y\\_Disturbios\\_del\\_Cafe&file=informacion&Id=13&NI=0](http://www.cenicafe.org/modules.php?name=Enfermedades_y_Disturbios_del_Cafe&file=informacion&Id=13&NI=0)
- DaMatta, F; Rodríguez, N. 2007. Producción sostenible de cafetales en sistemas agroforestales del Neotrópico: una visión agronómica y ecofisiológica. Agronomía Colombiana Vol.25 (1): 113-123.
- Dennis R.W.G. 1961. Fungi venezuelani: IV. Agaricales. Kew Bulletin Vol. 15 (1): 67-156
- Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; Gonzalez, L; Cuadroda, M; Robledo, CW. 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Guerra, B. 2004. Experiencias del manejo de las enfermedades fungosas presentes en el cultivo de café (*Coffea arabica*) en finca de pequeños caficultores en la aldea La Montaña, Moyuta, Jutiapa. Tesis Lic. San Carlos, Guatemala. 55p.
- Hernández, I. 2009. Diversidad de macrohongos de hojarasca en el bosque estatal de Guajataca. Tesis M.Sc. Universidad del Turubao, Puerto Rico. 93p.
- Hibbett D, Thorn R. 2001. Basidiomicotina: holobasidiomicetes. In The mycota VII Part B. Systematics and evolution. McLaughlin, McLaughlin, Lemke. eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 121-168.
- ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). 2011. Caficultores se preparan ante el cambio climático. Consultado 17 may. 2011. Disponible en [http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe\\_cambio\\_climatico/CLIMA%20CAFE%20-%20110211.pdf](http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe_cambio_climatico/CLIMA%20CAFE%20-%20110211.pdf)
- Kushalappa, A; Ludwig, A. 1982. Calculation of apparent rate in plant disease: development of method to correct for host growth. Phytopathology 72: 1373-1377.
- Moncalvo, JM; Vilgalys, R; Redhead, S; Johnson, JE; James, T; Aime, MC; Hofstetter, V; Verduin, S, Larsson, E; Baroni, TJ; Thorn, G; Jacobsson, S; Clemencon, H; Miller, OK. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. Molecular Phylogenetics and Evolution 23: 357-400.
- Montenegro, J. 2011. Cambio climático y la actividad cafetalera en Costa Rica. Presentación Power Point. Consultado 17 may. 2011. Disponible en [http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe\\_cambio\\_climatico/ICAFE-Marzo10-2011-F.pdf](http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe_cambio_climatico/ICAFE-Marzo10-2011-F.pdf)
- Monterroso, D. 1998. Posibilidades de manejo integrado de la enfermedad "Ojo de gallo" del café. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 47: I-IV. Sólo resumen.
- Muschler, R. 1997. Árboles en cafetales. Material de enseñanza No. 45. Colección de módulos de enseñanza agroforestal. Módulo 5. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 139 p.

- Nutter, FW. 2007. The rol of plant disease epidemiology in developing successful integrated disease management programs. *In* Ciancio, A; Mukerji, KG. eds. General concepts in integrated pest and disease management. Springer. p. 45-79.
- Perfecto, I; Armbrecht, I; Philpott, S; Soto-Pinto, L; Dietsch, T. 2007. Shaded coffee and the stability of rainforest margins in northern Latin America. *In* Tscharntke T, Leuschner C, Zeller M, Guhardja E, Bidin A (eds). The stability of tropical rainforest margins, linking ecological, economic and social constraints of land use and conservation, Springer Verlag Berlin. p 227-263.
- Porras, A. 2000. Evaluación de la actividad in vitro del género *Hypocrea* contra 2 hongos fitopatógenos de importancia agrícola (*Fusarium* sp. y *Mycena citricolor*). Tesis Bach. Cartago, CR. ITCR. 97p.
- PROMECAFE (Programa Cooperativo para la protección y modernización de la caficultura en México, Centroamérica y Panamá). 1990. VIII Curso regional sobre fundamentos de la caficultura moderna. Turrialba, CR. CATIE. p. 6-7.
- Ramírez, C. 1994. Estudio preliminar sobre el efecto del manejo nutricional y de la luz en el contenido de cera cuticular y el uso de coberturas foliares en la infección de *Mycena citricolor* (Berk. y Curt) Sacc. en hojas de cafeto. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 70 p.
- Samayoa, JO; Sánchez, V. 2000. Importancia de la sombra en la incidencia de enfermedades en café orgánico y convencional en Paraíso, Costa Rica. *Agroforestería en las Américas*. 7(26): 34–36.
- Sileshi, G; Schroth, G; Rao, M; Girma, H. 2008. Weeds, disease, insect pests and tri-trophic interactions in tropical agroforestry. *In* Batish, D; Kohli, R; Jose, S; Singh, H. Ecological basis of agroforestry. CRC Press. Taylor y Francis Group. Boca Raton, FL. p. 73-94.
- Solano, J; Villalobos R. sf. Regiones y subregiones climáticas de Costa Rica. Consultado 02 may. 2015. Disponible en [http://www.imn.ac.cr/publicaciones/estudios/Reg\\_climaCR.pdf](http://www.imn.ac.cr/publicaciones/estudios/Reg_climaCR.pdf)
- Staver C; Guharay, F; Monterroso, D; Muschler, RG. 2001. Designing pest-suppressive multistrata perennial crop systems: shade-grown coffee in Central America. *Agroforestry Systems* 53: 151–170.
- Vargas, E; González, M; Umaña, G; Vargas, L. 1990. Nuevas alternativas de combate químico del ojo de gallo (*Mycena citricolor*). 12avo Simposio sobre Caficultura Latinoamericana. IICA, Costa Rica. p. 425.
- Vargas, LG. 2004. Bases epidemiológicas para el desarrollo de un sistema de pronóstico en ojo de gallo (*Mycena citricolor* Berk. y Curt) Sacc. en cafeto (*Coffea arabica*). Tesis M.Sc. San José, CR. UCR. 118p.
- Virginio, E; Abarca, S. 2008. Cafetales para servicios ecosistémicos, con énfasis en el potencial de sumideros de carbono. El caso de cooperativas cafetaleras afiliadas a COOCAFE Costa Rica. Informe final. CATIE- FUNCAFOR-COOCAFE-OIKOCREDIT. Consultado 02 may. 2011. Disponible en <http://www.coocafe.com/cafeforestal/docs/cafe-servicios-ecosist-co2.pdf>

- Wang, A; Arauz, LF. 1999. Aplicación de principios epidemiológicos para el combate de ojo de gallo en cafeto. *In* "Memoria" XI Congreso Agronómico /IV Congreso Nacional de Fitopatología. p. 9-12.
- Wang, A; Avelino, J. 1999. El ojo de gallo (*Mycena citricolor*). *In* Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. IICA, San José, Costa Rica. p. 243-260.
- Webster, J; Weber, R. 2007. Introduction to Fungi. 3ed. Cambridge University Press. 701p.
- Wellman, F. 1950. Dissemination of *Omphalia* leaf spot of coffee. Turrialba 1(1):12-27.

## Capítulo 4. Efecto de la aplicación de metabolitos secundarios de *Trichoderma* sobre la epidemia.

---

### Resumen

En Costa Rica se han hecho esfuerzos para incorporar el combate biológico en la estrategia de manejo del ojo de gallo para reducir los costos ambientales y económicos, ya que el combate químico calendarizado es la estrategia más usada. El antagonista mayormente estudiado ha sido *Trichoderma*, para el que se conoce su capacidad micoparasítica sobre lesiones de ojo de gallo. Recientemente, se menciona su habilidad para la producción de metabolitos secundarios involucrados en la regulación del crecimiento de las plantas y en la activación de las respuestas de defensa, en el caso de esta enfermedad no se conoce el impacto que puede tener su aplicación. Este estudio se planteó para aportar conocimiento acerca del posible efecto de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* sobre el desarrollo de la epidemia, con el fin de conocer su potencial como una herramienta en el manejo integrado de la enfermedad. El ensayo se realizó en tres fincas, se caracterizaron las parcelas experimentales mediante su topografía, análisis químico de suelos y follaje, de la altura de las plantas, número de tallos por planta, cantidad, género, altura y diámetro de los árboles de sombra. Los tratamientos evaluados fueron la aplicación de metabolitos al follaje o la hojarasca y fueron comparados con la estrategia química convencional que consiste en la aplicación de ciproconazole en mezcla con validamicina. Se cuantificó la cantidad total de lesiones y geminíferos activos por tratamiento para la totalidad del tiempo de evaluación y se calculó el área bajo la curva de desarrollo de las lesiones (ABCDL). El tratamiento que registró la menor cantidad de enfermedad fue el químico, con ABCDL= 642,78, seguido de la aplicación de metabolitos al suelo/hojarasca con ABCDL= 1 695 y por último el que consistió de aspersión de metabolitos al follaje con ABCDL= 2 473, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables evaluadas. Los tratamientos de aplicación al follaje (químico y biológico) se mantuvieron muy similares cuando las condiciones de lluvia fueron menores a 300 mm, cuando la precipitación aumentó lo hizo también la cantidad de lesiones presentes en el tratamiento de aspersión de metabolitos, mostrando relación con el aumento de las condiciones ambientales favorables al desarrollo de la enfermedad. Mientras que, la cantidad de lesiones en el tratamiento de aplicación al suelo/hojarasca aumentó exponencialmente aun en condiciones poco favorables para la epidemia. No se logró declarar diferencias entre tratamientos debido posiblemente a la variabilidad del sistema, por lo que se recomienda repetir el ensayo con una mayor cantidad de bloques, también se sugiere realizar el ensayo al menos en dos años consecutivos.

## Introducción

En Costa Rica el manejo del ojo de gallo se basa fundamentalmente en el combate químico, este se hace calendarizadamente y no se realiza una cuantificación para tomar la decisión de aplicar, por lo que no siempre es efectivo, especialmente cuando prevalecen condiciones de extrema humedad (Monterroso 1998, Mora 1999, Avelino *et al.* 2007).

Uno de los primeros productos usados para ojo de gallo fue el caldo bordelés, pero era poco efectivo y de alto costo económico, por lo que se inició con la evaluación de varias fuentes de cobre, encontrando buen efecto. De esta forma, desde hace más de 60 años, se utilizan los cúpricos como parte del combate químico. Empero, es difícil en las zonas con alta precipitación, mantener una capa adecuada de producto sobre el follaje, por ello se propuso cambiar de productos protectores a erradicantes. Así, se introdujeron los fungicidas a base de mercurio y arseniato (de plomo y de calcio) que resultaron muy efectivos (Carvajal 1939, Pérez 1952 citado por Echandi y Segall 1958, Echandi y Segall 1958). Sin embargo, debido a su inadecuada utilización se prohibió su importación y uso en el año 1990 (Mora 1999).

A partir de ese momento se inició con la evaluación de otros productos, dando como resultado el uso mayoritariamente de triazoles para el combate de la enfermedad. Actualmente, los productos registrados son clorotalonil, oxiclورو de cobre, hexaconazol, epoxiconazol en mezcla con pyraclostrobin, óxido cuproso y tebuconazol en mezcla con triadimenol para el manejo químico de la enfermedad en Costa Rica (Mora 1999, Insumosys 2015).

En la zona de Los Santos, se usa principalmente tebuconazole en mezcla con triadimenol (750 cc por hectárea), validamicina (2 litros por hectárea) y cyproconazol (400cc por hectárea), solo o en mezcla con validamicina<sup>17</sup>.

Se han realizado otros esfuerzos para lograr un manejo adecuado y sostenible del ojo de gallo; por ejemplo, investigaciones referentes a combate biológico, en las que se han evaluado tanto hongos como bacterias antagonistas. Se reporta el efecto *in vitro* y en campo de aislamientos de *Trichoderma* sp. y *T. harzianum*, para los que se ha determinado su capacidad de establecerse dentro del tejido necrótico de la lesión y su acción parasítica sobre micelio y

---

<sup>17</sup> Ureña, D. 2013. Manejo del ojo de gallo en la zona de Los Santos (Entrevista). Santa María de Dota, Coopedota R.L. Comunicación personal.

geminíferos. También, se conoce que es posible combinarlo con aplicaciones de cobre y que este no afecta el porcentaje de lesiones colonizadas por el biocontrolador, el cual es capaz de sobrevivir en las lesiones necróticas en la estación seca (Arroyo 1975, Vargas 1984, Porras 2000, Ojeda y Suèscum 2012).

Además de los ya conocidos mecanismos de competencia y micoparasitismo que presenta *Trichoderma*, se han propuesto otros mecanismos para explicar su efecto, como la producción de antibióticos o metabolitos secundarios, los cuales han sido estudiados a profundidad para muchas de las especies de *Trichoderma* y se ha encontrado que están involucrados tanto en la regulación del crecimiento de las plantas, como en la activación de las respuestas de defensa<sup>18</sup>. Estos metabolitos son capaces de activar el sistema de defensa y de estimular el crecimiento de las plantas, por aumento en la producción de biomasa total, debido a la promoción del crecimiento radical y foliar (Vinale *et al.* 2012). Un ejemplo de este efecto se reportó en pruebas bajo invernadero para manejo del hongo *Sclerotium cepivorum* en cebolla, al encontrar que las plantas expuestas a aplicaciones en “drench” de *Trichoderma asperellum* solo o en mezcla con *Beauveria bassiana*, mostraron mayores longitudes foliares y radicales, así como mayor cantidad de follaje, en comparación con las plantas sin aplicación de agentes de biocontrol (Granados 2004).

A partir de *T. viride*, *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. koningii* es frecuente purificar el metabolito 6 pentil-pirona, conocido como 6PP, el cual presenta actividad antifúngica, tanto *in vitro* como *in vivo*. Este antibiótico puede inducir resistencia y/o aumentar el rendimiento de los cultivos y se perfila como una alternativa a los productos químicos. Se han observado efectos benéficos en pruebas en las que se aplican los metabolitos previo a la inoculación del patógeno, por ejemplo, disminución de síntomas provocados por *Botrytis cinerea* y *Leptosphaeria maculans*, en tomate y canola, respectivamente. Otro ejemplo es la mejora en el crecimiento radical y foliar, al realizar aplicaciones en drench al suelo previas a la inoculación de *Fusarium moniliforme* en maíz (Vinale *et al.* 2014).

---

<sup>18</sup> Lorito, M. 2012. Uso de metabolitos secundarios de *Trichoderma* en el combate de enfermedades. (Entrevista). Laboratorio de Arboricultura, Botánica y Patología Vegetal de la Universidad de Napoli Federico II, Napoles, Italia,

Se dice que los resultados de la aplicación de los antibióticos purificados es similar a la aplicación del organismo vivo, con la ventaja de aumentar la efectividad y facilitar su implementación en el manejo del cultivo, deben ser aplicados de forma inundativa y pueden ser aplicados en combinación con fungicidas químicos, tanto en campo como en invernadero, ya que éstos pueden mejorar la eficacia de los fungicidas sistémicos y el antagonismo de bacterias biocontroladoras. Empero, es necesaria más investigación para determinar su efecto y su destino una vez que son aplicados al suelo o filoplano (Lorito *et al.* 1993, Lorito *et al.* 1994, Lorito 1998, Lorito *et al.* 2010, Vinale *et al.* 2014).

No se conoce acerca del impacto que puede tener la aplicación de productos formulados de esta manera sobre el ojo de gallo, ya sea de manera tradicional al follaje o bien con aplicaciones dirigidas al suelo y la hojarasca. Bajo el supuesto de que el patógeno puede sobrevivir como saprófito en el piso del cafetal, solo se cuenta con la recomendación de Mata y Obregón (2014) de realizar aplicaciones en período lluvioso de dos cepas nativas de *Trichoderma* (PB 17 y TF) en mezcla con *Bacillus subtilis* y aceite agrícola a la hojarasca para disminuir la presión de inóculo, la incidencia y la severidad de la enfermedad.

Por esto, se planteó la presente investigación, para aportar conocimiento acerca del impacto que tiene la aplicación de metabolitos secundarios de *Trichoderma* al follaje y al suelo/hojarasca sobre el desarrollo de la epidemia, con el fin de conocer su potencial como una herramienta en el manejo integrado de la enfermedad.

## **Materiales y Métodos**

El ensayo se estableció en las fincas G11, G15 y G31, entre junio y noviembre del 2013.

### **1. Caracterización de las áreas de estudio**

Se eligieron áreas de aproximadamente 300 m<sup>2</sup> en cada finca, en los que de acuerdo a la experiencia del productor o encargado, se haya presentado históricamente la enfermedad en similar magnitud.

Se caracterizó cada parcela experimental mediante su topografía, análisis químico de suelos y follaje, del registro de altura de las plantas, número de tallos por planta, cantidad, género, altura y diámetro de los árboles de sombra.

## 2. Establecimiento de los ensayos

El diseño de los tratamientos fue de estructura simple y el diseño experimental de bloques completos al azar, se probaron 3 tratamientos en 3 bloques (fincas).

Las plantas de estas áreas se mantuvieron bajo el manejo rutinario de las fincas.

La parcela útil fue de 5 plantas y el borde de tres. Se evaluaron 5 bandolas por planta distribuidas en el tercio inferior, medio y superior, siempre en la misma posición de acuerdo al número de bandola. Para un total de 225 bandolas evaluadas.

Cada 14 días se registró la cantidad de lesiones y geminíferos activos presentes en cada bandola. Los tratamientos evaluados fueron:

- 1) Aplicación de validamicina (2 L/ha) en mezcla con ciproconazole (400 cc/ha) (**Fungicida**).
- 2) Aplicación de metabolitos (10L/ha) de *Trichoderma* al follaje (**Metabolitos al follaje**)
- 3) Aplicación de metabolitos (10L/ha) de *Trichoderma* al suelo y la hojarasca (**Metabolitos a la hojarasca**)

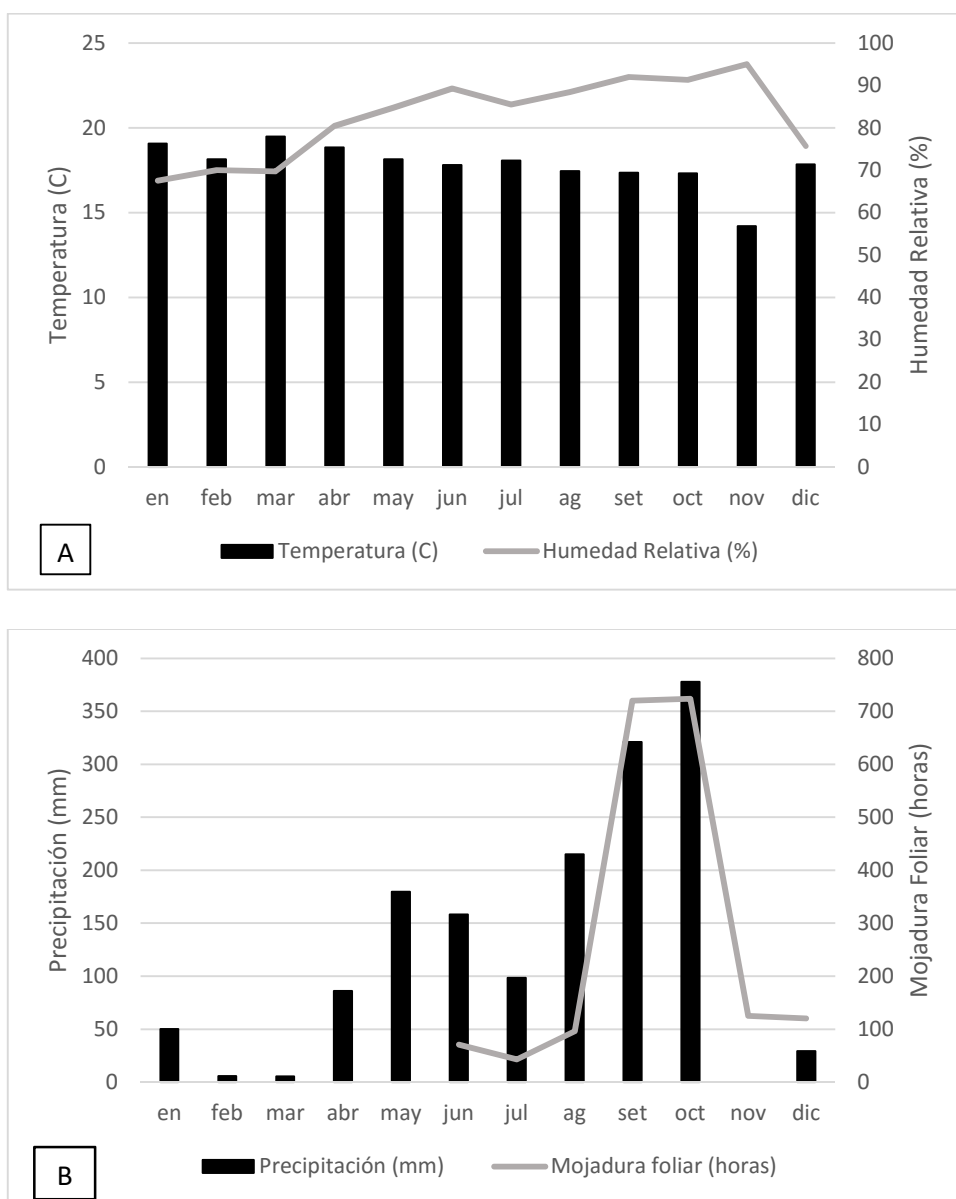
El producto a base de *Trichoderma*, se compone de  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas y metabolitos 6-pentyl- $\alpha$ -pyrona (6PP). El producto comercial aplicado contiene 3% de materia orgánica y 1g/L de enzimas y metabolitos.

Se realizaron 3 aplicaciones entre junio y octubre, a saber, 25/06/2013, 10/09/2013 y 08/10/2013.

Con los datos colectados se describió el progreso de la enfermedad por medio del área bajo la curva (ABCDL) del promedio de las lesiones presentes.



Durante el año en estudio se presentaron las condiciones ambientales que se detallan en la Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Condiciones climáticas registradas en la zona de estudio. **A)** Temperatura (°C) y humedad relativa (%), **B)** Precipitación (mm) y mojadura foliar. Zona de Los Santos, 2013.

### 3. Manejo y análisis de los datos

Se realizó un ANDEVA para determinar si existían diferencias entre bloques o tratamientos, para las variables área bajo la curva de desarrollo de las lesiones, cantidad de lesiones

presentes y cantidad de geminíferos activos presentes. Luego se realizó la prueba de comparación de medias LSD de Fischer al 95 % de confianza, para determinar la magnitud de la diferencia. Los datos se analizaron por medio del programa de análisis estadísticos Infostat versión 2015 (Di Rienzo *et al.* 2015) y las gráficas se realizaron con la opción de gráficos de Excel de Microsoft Office 2013.

## Resultados

Todas las parcelas experimentales presentaron una topografía similar y en todas hubo presencia de sombra de poró (*Erythrina* spp.). Las áreas donde se ubicó el tratamiento “Metabolitos al follaje” fueron las que, en promedio, presentaron menor cantidad de árboles aunque de mayor diámetro de tronco. En el tratamiento “Fungicida” las plantas fueron más altas y con mayor número de tallos (Cuadro 4.1).

**Cuadro 4.1.** Topografía, altura de plantas (cm), número de tallos por planta y altura (cm), diámetro (cm) del tronco principal y género de los árboles presentes en las áreas de estudio donde se ubicó cada tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de *Trichoderma*. Zona de Los Santos, 2013.

Característica	Tratamiento		
	Fungicida	Metabolitos al follaje	Metabolitos a la hojarasca
Topografía	Plano/Empinado	Plano/Empinado	Plano/Empinado
Altura de plantas (cm)	218±7,15	210±5,45	171±11,15
Número de tallos/planta	4,53±0,76	3,47±0,59	3,80±0,73
Altura de árboles (cm)	461,21±52,60	519,23±32,68	534,26±35,25
Diámetro de árboles (cm)	29,42±7,98	46,33±8,64	29,53±6,95
Cantidad total de árboles	10	9	12
Género de árboles	<i>Annona, Erythrina, Musa</i>	<i>Annona, Erythrina, Musa, Grevillea, Cítricos</i>	<i>Annona, Erythrina, Musa, Grevillea</i>

Con respecto a las características químicas del suelo, las áreas de los tres tratamientos presentaron problemas por condiciones de acidez (pH menor a 5,5). Los niveles de K, P, Fe y Mn se encuentran por encima de los óptimos para el cultivo en los tres tratamientos (Cuadro 4.2).

**Cuadro 4.2.** Contenido nutricional del suelo en las áreas de estudio donde se ubicó cada tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de *Trichoderma*. Zona de Los Santos, 2013.

Tratamiento	Característica											
	pH	ACIDEZ	Ca	Mg	K	CICE	%SA	P	Zn	Cu	Fe	Mn
	cmol(+)/L						mg/L					
	5,5	0,3	4-20	1-10	0,2	5	<10	10-30	3-15	1-20	10-50	5-50
Fungicida	4,9	1,42	7,59	1,70	1,19	11,91	12,34	35,23	5,55	12,02	352,57	61,93
Metabolitos al follaje	4,8	1,08	8,04	1,63	1,07	11,82	8,84	58,60	5,04	17,72	385,00	97,97
Metabolitos a la hojarasca	4,7	2,00	7,08	1,53	0,71	11,32	16,46	41,40	4,07	12,16	343,42	90,28

Los contenidos de nutrientes foliares, en todos los tratamientos, se encuentran dentro de los rangos aceptados como óptimos para café, excepto para el azufre y el hierro, con valores por debajo del crítico (Cuadro 4.3).

**Cuadro 4.3.** Contenido nutricional del follaje de las plantas ubicadas en cada tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de *Trichoderma*. Zona de Los Santos, 2013.

Tratamiento	Elemento												
	N	P	Ca	Mg	K	S	Na	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Al
	%						mg/L						
	2,5-3,5	0,15-0,35	0,8-1,6	0,3-0,5	2,0-3,0	0,25-0,50	90-300	10-50	15-200	50-300	25-75		
Fungicida	3,25	0,15	0,85	0,30	2,35	0,18	21,33	61,33	25,00	11,33	148,33	29,33	18,33
Metabolitos al follaje	3,26	0,14	0,98	0,31	2,26	0,18	21,80	65,67	26,33	11,67	266,33	27,67	28,67
Metabolitos a la hojarasca	3,30	0,15	0,89	0,32	2,29	0,17	17,76	54,00	21,00	11,67	180,00	26,00	19,33

En el tratamiento “Fungicida” fue en el que se registró la menor cantidad de enfermedad, lesiones y geminíferos activos (Cuadro 4.4, Cuadro 4.5 y Cuadro 4.6).

**Cuadro 4.4.** Área bajo la curva de desarrollo de las lesiones (ABCDL) por tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de *Trichoderma*. Zona de Los Santos, 2013.

Tratamiento	ABCDE
Fungicida	642,78 <sup>a</sup>
Metabolitos al follaje	2472,72 <sup>a</sup>
Metabolitos a la hojarasca	1695,41 <sup>a</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acuerdo a la prueba LSD Fischer.

En los tratamientos de aplicación de metabolitos secundarios de *Trichoderma* se registraron entre 3 y 4 veces más lesiones que en el tratamiento de aplicación de fungicida (Cuadro 4.5).

**Cuadro 4.5.** Cantidad total de lesiones de ojo de gallo durante todo el período de evaluación por tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de *Trichoderma*. Zona de Los Santos, 2013.

Tratamiento	Lesiones
Fungicida	385 <sup>a</sup>
Metabolitos al follaje	1330 <sup>a</sup>
Metabolitos a la hojarasca	919 <sup>a</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acuerdo a la prueba LSD Fischer.

No se halló diferencia estadísticamente significativa entre bloques ni tratamientos para la cantidad total de lesiones.

La cantidad total de geminíferos activos mostró diferentes valores para cada tratamiento, siendo que “Metabolitos al follaje” registró la mayor cantidad, 12 veces más que el tratamiento F (Cuadro 4.6), aunque no se declaran diferencias estadísticamente significativas entre bloques ni tratamientos para esta variable.

**Cuadro 4.6.** Cantidad total de geminíferos activos de *Mycena citricolor* durante todo el período de evaluación por tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de *Trichoderma*. Zona de Los Santos, 2013.

Tratamiento	Geminíferos activos
Fungicida	100 <sup>a</sup>
Metabolitos al follaje	1244 <sup>a</sup>
Metabolitos a la hojarasca	678 <sup>a</sup>

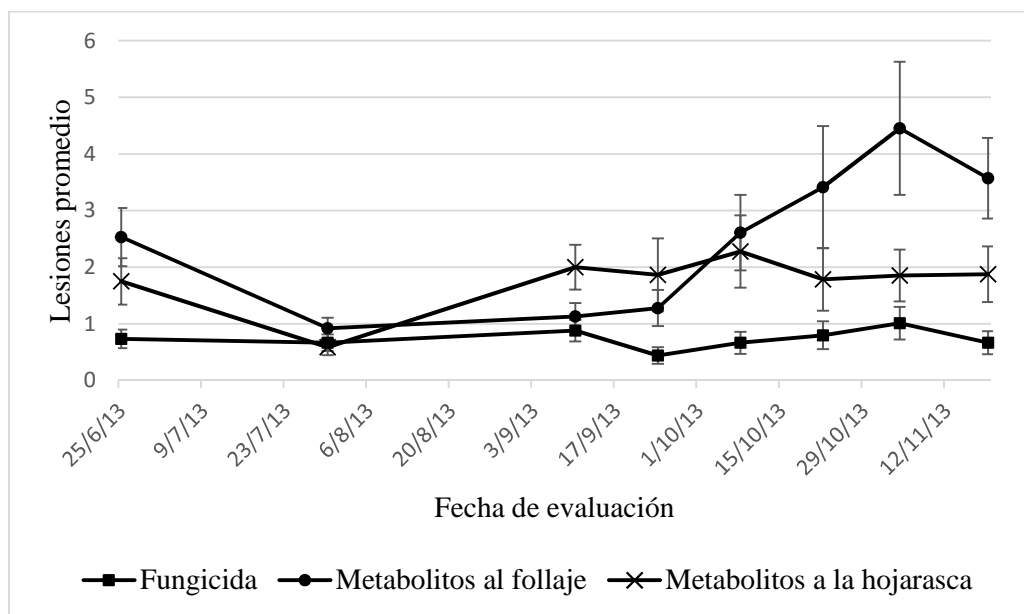
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acuerdo a la prueba LSD Fischer.

La cantidad de lesiones presentes en el tratamiento “Fungicida” en todas las fechas de evaluación no superó las 76 lesiones, las cuales se registraron en la evaluación del 4/11/13 (Figura 4.2).

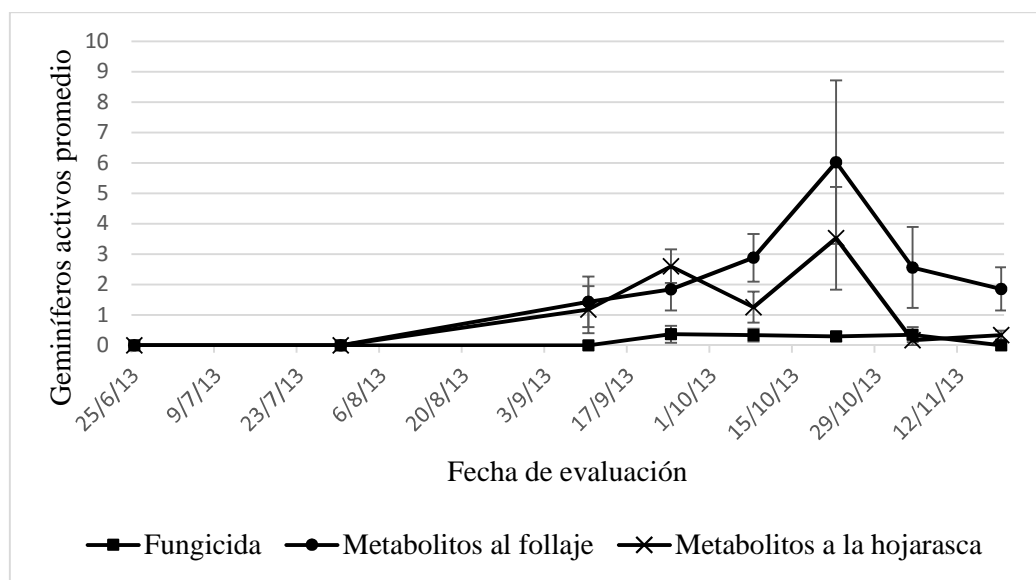
A partir de la tercera evaluación (10/9/13), los tratamientos de aplicación de metabolitos secundarios permanecieron con mayor cantidad de lesiones que el tratamiento químico, se registraron 85 lesiones para “Metabolitos al follaje”, 150 lesiones para “Metabolitos a la hojarasca” y 66 lesiones para “Fungicida” en esa fecha (Figura 4.2).

El tratamiento “Metabolitos a la hojarasca” alcanzó el máximo de lesiones presentes en la quinta evaluación (8/10/13) con 171 lesiones y el tratamiento “Metabolitos al follaje” llegó

a su máximo de 334 lesiones presentes en la séptima evaluación, realizada el 4/11/13 (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Curva de progreso del ojo de gallo (cantidad presente de lesiones) por tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de *Trichoderma*. Zona de Los Santos, 2013.



**Figura 4.3.** Cantidad presente de geminíferos activos por tratamiento del ensayo de metabolitos secundarios de *Trichoderma*. Zona de Los Santos, 2013.

No se registraron geminíferos en las dos primeras lecturas, en la tercera (10/9/13) para el tratamiento “Metabolitos al follaje” se anotó 107 y para “Metabolitos a la hojarasca” 88

geminíferos activos. La cantidad de estructuras no superó los 30 para el tratamiento químico en ninguna de las evaluaciones. Los tratamientos de aplicación de metabolitos llegaron al máximo en la misma fecha de evaluación (22/10/13), “Metabolitos la follaje” presentó 452 y “Metabolitos a la hojarasca” 264 geminíferos activos (Figura 4.3).

## Discusión

En general las áreas de estudio presentaron las mismas condiciones para el desarrollo del cultivo en lo referente a composición nutricional del suelo y el follaje de las plantas evaluadas, por lo que se descarta algún efecto sobre los tratamientos debido a estos factores.

El tratamiento “Fungicida” que consistió en la aplicación de los productos químicos ciproconazole en mezcla con validamicina, tradicionalmente usados en la zona para el combate del ojo de gallo, fue el que reportó menor enfermedad de los tres, con un área bajo la curva de 642,78; mientras que los tratamientos a base de *Trichoderma* obtuvieron 1 695,41 cuando fue aplicado al suelo/hojarasca y 2 472,72 cuando se asperjó el follaje.

Dedido a que no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos, no se puede decir cual tratamiento fue el mejor; probablemente si se hubiese contado con mayor cantidad de repeticiones (bloques) se hubieran declarado diferencias estadísticas. Sin embargo, desde el punto de vista biológico y agrícola es evidente que la mezcla de fungicidas logró mantener la enfermedad en niveles bajos. Aun cuando, las áreas donde se ubicó este tratamiento presentaron mayor densidad de follaje total (cultivo más vegetación acompañante), contribuyendo al mantenimiento de condiciones húmedas que benefician al patógeno, ya que habían árboles de sombra más bajos y plantas con mayor altura y con más número de tallos. De hecho, Barquero (2012) recomienda como medidas de combate cultural, el arreglo de la sombra en los meses de mayor nubosidad, así como puntos de siembra de 2 ejes para facilitar que las plantas se sequen con mayor rapidez, evitando las condiciones favorables para el desarrollo del ojo de gallo.

Los resultados obtenidos con el tratamiento químico aplicado fueron los esperados, ya que en pruebas de eficacia biológica de más de 45 fungicidas evaluados por el ICAFE, las mezclas de ciproconazole o tebuconazole más validamicina en tres aplicaciones fueron las que presentaron mejor control de la enfermedad, mientras que productos no sistémicos o de

tipo protector se comportan igual a no aplicar agroquímicos (Barquero 2011). Situación que podría explicar los resultados de los otros tratamientos.

Desde el punto de vista agronómico y recalando que no se hallaron diferencias estadísticas, se puede comentar que en el tratamiento de aplicación de metabolitos al piso del cafetal se cuantificó menor cantidad de lesiones y geminíferos activos, en comparación con el tratamiento de aplicación de metabolitos al follaje; probablemente las plantas en el último tratamiento se mantuvieron húmedas por períodos más prolongados debido a la naturaleza de la aplicación, condición que favorece el desarrollo de lesiones e inóculo secundario. Con los resultados obtenidos se podría pensar que el comportamiento del tratamiento de aplicación de metabolitos al suelo y hojarasca están indicando la disminución de la presión de inóculo presente en estos sustratos; sin embargo en investigación paralela, se halló que la presencia o ausencia de hojarasca no influye sobre el desarrollo de la epidemia, pero sí la cantidad de lesiones iniciales presentes en las plantas; por lo que se presume que las aplicaciones al suelo/hojarasca no deberían causar ningún impacto de importancia sobre la enfermedad.

Aunque no se incluyó el tiempo como un factor en el análisis de este experimento, es posible detallar el comportamiento de los tratamientos conforme a cada fecha de evaluación con la finalidad de entender la situación. Así, el tratamiento “Metabolitos al follaje” mostró un grado de efectividad cercano al tratamiento químico hasta la tercera evaluación, mientras que en el tratamiento “Metabolitos a la hojarasca” se incrementó la cantidad de lesiones muy rápidamente en este período. Entonces, el desarrollo de las lesiones en el tiempo, muestra que aún bajo condiciones de precipitación menor a los 300 mm (entre la primera y la cuarta evaluación) en el tratamiento de aplicación al suelo/hojarasca se incrementó la cantidad de lesiones exponencialmente, mientras los otros tratamientos se mantenían por debajo de este. Sin embargo, en períodos de precipitación mayor (a partir de la evaluación del 24/9/13) la cantidad de lesiones en el tratamiento “Metabolitos al follaje” presenta un crecimiento típicamente logarítmico, que contrasta con el comportamiento del tratamiento de aplicación de fungicida, y sobrepasa el tratamiento de aplicación al suelo/hojarasca, mostrando así que el aumento en la precipitación, humedad relativa y el período de mojadura foliar aparentemente afectó más a las plantas con aplicación foliar de producto biológico.

Entre la segunda y tercera aplicación, realizadas en la tercera y quinta fecha de evaluación respectivamente, los valores de lesiones presentes incrementaron un 260% en el tratamiento “Metabolitos al follaje” y un 114% en “Metabolitos a la hojarasca”, lo que refuerza la idea de que la mayor cantidad de lesiones en “Metabolitos la follaje” se deben a un efecto de mayor mojadura foliar combinado con condiciones altamente favorables para *Mycena citricolor*, ya que es en ese período que se registraron los mayores valores de precipitación, humedad relativa y horas de mojadura foliar. Posiblemente, el tratamiento “Metabolitos a la hojarasca” refleja el comportamiento natural de la enfermedad sin la aplicación de ninguna estrategia de combate y el tratamiento “Metabolitos al follaje” esté indicando el efecto de largos períodos de mojadura foliar y humedad sobre la enfermedad.

Un comportamiento similar fue hallado por Hidalgo *et al.* (2011) al evaluar un producto biológico a base de *Streptomyces griseovirides*. En ese experimento el tratamiento químico (ciproconazole) registró la menor cantidad de lesiones y se mantuvo en todas las evaluaciones con valores inferiores al tratamiento biológico. La cantidad de lesiones por hoja se disparó en los meses de alta precipitación y con mayor velocidad en el tratamiento de aplicación de *S. griseovirides*.

Al respecto, Barquero (2012) determinó que las horas de mojadura foliar, la cantidad de lluvia, así como la cantidad de días con lluvia son los principales indicadores que explican el progreso de la enfermedad. De esta manera, si se acumulan 400 mm de lluvia en 3 semanas consecutivas, con al menos 4 días con lluvia por semana y 15 horas de mojadura foliar hay riesgo de que se presente la enfermedad. En este ensayo, entre la cuarta y quinta evaluación fue cuando se presentó un crecimiento más acelerado de la enfermedad en el tratamiento TF, 22 días antes de ese período se acumularon 270 mm de lluvia, cantidad que, de acuerdo a este autor no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad; sin embargo se debe contabilizar el agua adicionada al follaje vía aplicación del tratamiento, con lo cual se incrementan las posibilidades de obtener condiciones favorables para el progreso de la enfermedad.

Tampoco se determinó diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos para la variable cantidad de geminíferos activos presentes. Aunque se debe hacer notar que el tratamiento “Fungicida” presenta los valores más bajos.



Al respecto, Vargas (1984) reportó un efecto de disminución en la cantidad total de “cabecitas” y lesiones con “cabecitas” con la aplicación de *Trichoderma* al follaje, sin embargo el antagonista fue mezclado con oxiclورو de cobre, por lo que posiblemente el producto químico mejoró la eficiencia del antagonista por eliminación de competidores.

La disminución en la cantidad de lesiones en algunas fechas de evaluación, se debe a la caída de follaje enfermo que no permitió la cuantificación de las lesiones en esas hojas, la variable defoliación de hojas enfermas no fue cuantificada en este ensayo. Por otro lado, la disminución en las lecturas de geminíferos activos en algunas fechas, puede deberse a varias razones, entre ellas la caída de follaje enfermo, que es lo que probablemente ocurrió en las lecturas del 4/11/13 y 19/11/13 las que coinciden con disminución de lesiones; también puede explicarse debido a que aunque hayan lesiones estas no produjeron geminíferos nuevos entre una evaluación y otra, ya que sólo se contabilizaron geminíferos erectos de color amarillo brillante (activos) y no geminíferos que aunque presentes estaban deshidratados o inmaduros.

Se conoce que la eficacia de biocontrol de *Trichoderma* puede depender de su interacción con los componentes bióticos del medio ambiente y del suelo. De hecho, las interacciones planta-suelo-microorganismos-ambiente son moduladas por el entorno, es decir que las condiciones ambientales como la temperatura, la luminosidad, la precipitación y la humedad relativa, así como las características físicas y químicas del suelo, intervienen directamente en el desarrollo de cualquier tipo de interacción, entre las plantas y los antagonistas, por lo que es difícil entender completamente el funcionamiento del sistema (Bae y Knudsen 2005, Cano 2011).

En síntesis, aparentemente no es recomendable la aplicación de este tipo de productos a nivel de follaje, ya que favorece la producción de lesiones e inóculo secundario, lo que promueve mayor cantidad de ciclos de infección y por ende mayor cantidad de enfermedad total. Por otro lado, no se tiene claro el efecto de la aplicación del producto a nivel de suelo/hojarasca, ya que su aparente impacto en disminuir la enfermedad puede ser un efecto confundido. En conclusión, no hay evidencia suficiente para determinar el impacto de la aplicación del producto a base de metabolitos secundarios de *Trichoderma* sobre el desarrollo de la enfermedad.

## Sugerencias

1. Realizar una prueba *in vitro* para evaluación del efecto de los metabolitos sobre *M.citricolor*.
2. Repetir la prueba y evaluar otras variables como crecimiento del hospedero y cosecha, para determinar el efecto sobre vigor de la planta y determinar el efecto de los metabolitos sobre el rendimiento.

## Literatura citada

- Arroyo, T. 1975. Control biológico del ojo de gallo en el café causado por *Mycena citricolor* (Berk & Curt) Sacc. en época seca. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 65p.
- Avelino J, Cabut S, Barboza B, Barquero M, Alfaro R, Esquivel C, Durand JF, Cilas C. 2007. Topography and crop management are key factors for the development of american leaf spot epidemics on coffee in Costa Rica. *Phytopathology* 97: 1532-1542.
- Bae Y.S, Knudsen G.R. 2005. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Biol. Control*. 32:236-242.
- Barquero M. 2011. Consideraciones sobre la relación beneficio/costo del control químico del ojo de gallo. *Revista informativa*. Número 1 Año 5. ICAFE. p 1-4.
- Barquero M. 2012. Sistema de alerta temprana para el ojo de gallo. *Revista informativa*. Número 2 Año 6. ICAFE. p 2-4.
- Carvajal F. 1939a. Ojo de gallo (*Omphalia flavida*). *Revista del Instituto de Defensa del Café de Costa Rica*. Tomo 7. No.52. p. 535-549.
- Cano, M.A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 14(2): 15-31.
- Echandi E, Segall R.H. 1958 The effectiveness of certain eradicant fungicides on inhibition of gemma of *Mycena citricolor*. *Phytopathology* Vol. 48:11-14.
- Granados, MM. 2004. Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Tesis M.Sc. Universidad de Costa Rica. 92p.
- Hidalgo V, Paredes A, Alvarado D. 2011. *Streptomyces griseovirides* cepa MOG01 antagónico de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el cafeto (*Coffea arabica*). *Tierra Tropical* 7(2):229-238.
- Insumosys. 2015. Productos registrados bajo la búsqueda café+*Mycena citricolor*. Centro de consulta de insumos. Servicio Fitosanitario del Estado. Costa Rica. (en línea). Consultado 09 jul. 2015. Disponible en <http://www.sfe.go.cr/insumosys>
- Lorito, M; Di Pietro, A; Hayes, CK; Woo, SL; Harman, GE. 1993. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology* 83:721-728.
- Lorito, M; Peterbauer, C; Hayes, CK; Harman, GE. 1994. Synergistic interaction between fungal cell wall-degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Mycobiology* 140:623-629. *Fuente original*: Lorito, M. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. In GE. Harman; CP. Kubicek. eds. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis. 393p.

- Lorito, M. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. *In* GE. Harman, CP; Kubicek. eds. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control and commercial applications. 1998. Taylor and Francis. 393p.
- Lorito, M; Woo, SL; Harman, GE; Monte, E. 2010. Translational research of *Trichoderma*: from 'Omics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:395-417.
- Mata X, Obregón, M. 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en Costa Rica. *In* Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. Bettiol W, Rivera C, Mondino P, Montealegre J, Colmenárez Y. 404 p.
- Mora J. 1999. El papel del MAG en el combate del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el cultivo del café. *In* "Memoria" XI Congreso Agronómico /IV Congreso Nacional de Fitopatología. p.17-19.
- Monterroso, D. 1998. Posibilidades de manejo integrado de la enfermedad "Ojo de gallo" del café. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 47: I-IV. *Sólo resumen*.
- Ojeda K, Suèscom J. 2012. Evaluación de cinco cepas de hongos nativos como controladores biológicos de la enfermedad "Ojo de Pollo" (*Mycena citricolor*) en café (*Coffea arabica*) en condiciones *in vitro*. Tesis Bach. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador. 68p.
- Pérez V.M. 1952. Control del "ojo de gallo" por medio de fungicidas. Suelo Tico 6:264-271. *Fuente original*: Echandi E, Segall R.H. 1958. The effectiveness of certain erradicant fungicides on inhibition of gemma of *Mycena citricolor*. *Phytopathology* Vol. 48:11-14.
- Porras A. 2000. Evaluación de la actividad *in vitro* del género *Hypocrea* contra 2 hongos fitopatógenos de importancia agrícola (*Fusarium* sp. y *Mycena citricolor*). Tesis Bach. ITCR. Cartago, Costa Rica. 87p.
- Vargas, E. 1984. Interacción de tratamiento biológico y químico en el combate del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el cafeto. *Agronomía Costarricense* 8 (2): 91-97.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E, Woo S, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Ruocco M, Lanzuise S, Manganiello S, Lorito M. 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal* 8 (Suppl-1, M5):127-139.

## Discusión general

---

Este estudio reveló la importancia potencial de la vegetación acompañante como fuente de inóculo primario del ojo de gallo, ya que se encontró que las cepas provenientes de hospederos alternos tienen mayores índices de patogenicidad que la cepa proveniente de café (Cuadro 2.16). Se debe mencionar que, la patogenicidad de las cepas estudiadas se disminuyó *in vitro*, por lo que este tipo de estudios debe realizarse con inóculo proveniente directamente de campo.

Al respecto, se ha documentado que *Mycena citricolor* puede atacar alrededor de 219 hospederos en 80 familias de plantas (Maublanc y Rangel 1914, Carvajal 1939b, Sequeira 1958, Urtiaga 1986 citado por De la Iglesia y Cascaret 2000, Arnold 1986 citado por De la Iglesia y Cascaret 2000, Pacheco 2012, Plantwise 2015) (Cuadro 1). Además, en esta investigación se registran 13 nuevos géneros hospederos, todos hallados con síntomas y signos de ojo de gallo en zonas que históricamente han presentado alta incidencia y severidad de la enfermedad (Cuadro 2.5, Cuadro 2.6 y Cuadro 3.11).

Es importante subrayar que muchos de los árboles usados comúnmente como sombra o cultivo intercalado con el cafeto, tales como el poró y el aguacate; así como especies nativas de la zona de estudio, como el ratoncillo, el vainillo y la dama, que se encuentran amplia y uniformemente distribuidos en las plantaciones, son hospederos de *M. citricolor*.

Otro árbol al que se le debe prestar atención es a la higuerilla, que está registrada como hospedera, aunque todavía no se conoce la patogenicidad del inóculo. Esta especie recientemente fue impulsada como sombra y distribuida en muchas fincas, debido a que su semilla puede ser utilizada como fuente de biodiesel en el beneficiado del grano, con lo que se reduciría la huella ecológica del cultivo.

Lo anterior representa un riesgo de producción, ya que pueden servir como fuentes de inóculo para el cultivo, con la desventaja de que a estos hospederos no se les ejerce ningún tipo de manejo tendiente a la reducción de inóculo, debido a que la mayoría de los productores desconocen esta información.

Entonces, se debe tener cuidado con la elección de las especies de árboles de sombra, ya que si bien es cierto el asocio con árboles potencializa al cultivo de café como un sistema agroforestal que puede ofrecer servicios ecosistémicos y le permite adaptarse al cambio climático, como lo mencionan DaMatta y Rodríguez (2007) y Montenegro (2011). Se debe tomar en cuenta que los árboles pueden estar aumentando la cantidad de inóculo potencial de la enfermedad y además, como es conocido, favorecer el desarrollo del ojo de gallo por permitir largos períodos de mojadura foliar y elevada humedad relativa como lo apuntan Samayoa y Sánchez (2000) y Staver *et al.* (2001).

Es de recalcar que ésta es la primera investigación en la que se evalúa la patogenicidad del inóculo producido en las lesiones presentes en hospederos diferentes al cafeto, con miras a entender su posible rol epidemiológico. Además, y de especial relevancia, se demostró que el inóculo proveniente de lesiones producidas en café Catimor Costa Rica 95 fue más patogénica que la proveniente de la variedad Caturra (Cuadro 2.16).

Es conocido que las variedades derivadas del Híbrido de Timor (HdT) son más susceptibles al ojo de gallo, Santacreo (2001) y Avelino *et al.* (2007) indican que en general, las variedades Caturra, Catuaí y Villa Sarchí tienen mayor tolerancia a la enfermedad que los Catimores. Pero, nunca antes se había determinado el nivel de patogenicidad de los geminíferos producidos en plantas de este tipo; en esta investigación se determinó que los geminíferos de la cepa de Catimor-CR95 fueron más patogénicos, con un Índice de Patogenicidad de 9,94 versus 3,66 de la cepa de Caturra (Cuadro 2.16).

Entre los resultados principales, se encuentra el hecho de que las lesiones de ojo de gallo presentes en las arvenses y café Catimor fueron de mayor diámetro y presentaron más geminíferos que las desarrolladas en café Caturra (Figura 2.10, Figura 2.12 y Figura 2.13).

Además, se encontró estructuras en lesiones presentes en arvenses pero no en el café, en una misma época de muestreo, esto permite especular que las arvenses pueden estar sirviendo como fuente de inóculo de forma más temprana que las lesiones presentes en las plantas de cafeto. Por lo que una estrategia de manejo sería la eliminación selectiva de estas arvenses de las plantaciones en la época de verano, para evitar la producción de inóculo que funcione como inóculo primario para la enfermedad en invierno.

Esta información es de considerable valor, ya que aunque en Costa Rica se decretó la eliminación y se prohibió la siembra de variedades derivadas de la “sangre robusta” desde 1989 (Ley N°19302-MAG) por mostrar inferior calidad de taza; en la práctica muchos productores siguen conservando áreas sembradas con variedades como Costa Rica 95 (Caturra X HdT) debido a su mayor productividad (Cuadro 3.11).

La siembra de estos cultivares ha tomado fuerza luego de la última epidemia de roya (cosecha 2012-2013), ya que estas líneas presentan mayor tolerancia a *Hemileia vastatrix*. Según Anzueto (2013) las siguientes variedades procedentes del HdT son resistentes a la roya y útiles en una estrategia de manejo para esta enfermedad, Catimor T-5269, Catimor T-5175, Catimor T-8667 y variedades derivadas “Costa Rica 95” y “Lempira”, Sarchimor T-5296 y la variedad derivada “Parainema”, además menciona otros Sarchimores como IAPAR 59, TUPÍ, OBATÁ, Variedades Colombia y Castillo regionales, ICATU y CATUCAI.

El uso de cualquiera de esas variedades se considera una práctica de manejo inconveniente si se trata del ojo de gallo, sobretodo en regiones altas, de los 1 000 a los 1 700 msnm y con temperaturas de 17 a 23 grados centígrados, zonas donde, de acuerdo al ICAFE (2012), se produce el 80 % del café de mayor calidad y que son regiones que presentan condiciones ambientales típicamente más conducentes para el ojo de gallo que para la roya. Por lo que la determinación de la patogenicidad del eventual inóculo que pueden producir es de suma importancia.

La práctica de ubicar variedades inadecuadas en zonas favorables vulnerabiliza la actividad cafetalera, ya que se estarían colocando variedades muy susceptibles y que producen inóculo más patogénico, como el caso de CR95, con el peligro inminente de epidemias severas de ojo de gallo, aún en años con condiciones de precipitación normales. Lo cual causaría pérdidas económicas para los productores, no solo por el aumento en los costos de producción, sino por la disminución en el rendimiento por la defoliación de plantas enfermas y consecuentemente menores ingresos por menores volúmenes de venta.

Santacreo (2001) dice que el uso apropiado de las variedades se puede considerar dentro de una estrategia de manejo integrado, recalcando que en localidades con alturas entre los 800-1 400 msnm, donde la roya no sea problema y el ojo de gallo o la mancha de hierro

(*Cercospora coffeicola*) puedan causar daños económicos, la siembra de la variedades Catuaí, Caturra y Villa Sarchí es una buena alternativa, mientras que, en zonas donde la roya es de importancia económica, se recomiendan las variedades de Catimor.

Por lo tanto, se debe tener especial cuidado con el uso de variedades, ya que es una estrategia fundamental en el manejo integrado y sostenible de cualquier enfermedad. No se logrará un nivel de manejo adecuado si se tiene la variedad equivocada, es decir, una variedad más susceptible; al contrario, si desde el inicio del cultivo se piensa en utilizar variedades que presenten tolerancia al patógeno, las otras tácticas, ya sean químicas, biológicas o culturales, tendrán mayor impacto en la sanidad del cultivo.

Sobre todo si se presentan años con precipitaciones mayores a lo normal para la zona, como lo ocurrido en el 2010, cuando se presentó un efecto Niña muy marcado, en el que hubo un exceso de lluvia de 65% en la zona Pacifico Central, zona de influencia de la región de Los Santos.

Las mayores precipitaciones se presentaron en los meses de setiembre y octubre, meses que históricamente son más conducentes para el desarrollo de la enfermedad debido a que las lluvias son más intensas; ese año además, no se dio el fenómeno conocido como “canícula” o “veranillo de San Juan” provocando que se presentaran condiciones favorables para el ojo de gallo desde julio, así, el 2010 fue considerado como “lluvioso extremo”, pues en tan solo 4 días de lluvia en octubre se acumularon hasta 650mm.

Si se comparan estos datos con los valores propuestos por Barquero (2012) para estimar el riesgo de ocurrencia de la enfermedad, de 3 semanas de lluvia consecutiva con un acumulado de 400mm, se nota como en únicamente 4 días se cumplió con los requerimientos para el desarrollo de la epidemia, por lo que los niveles de enfermedad en ese año fueron muy altos, provocando pérdidas del 12% (276 577 fanegas) de la cosecha estimada para el año productivo 2010-2011, lo que representó unos \$60 millones USD de pérdidas concentradas en las zonas del Valle Central y la Zona de Los Santos (Barquero 2010 a y b).

Contrariamente, en los años en que se llevó a cabo este estudio, se registró una disminución en la intensidad del ojo de gallo, así se cuantificó un nivel de enfermedad promedio alrededor de 50% en 2011 y 2012, disminuyó a más o menos 25% en 2013 y cerca del 20% en el 2014,



lo que estuvo relacionado a la cantidad de lluvia acumulada de esos años, los cuales según el Instituto Meteorológico Nacional (2015) fue un período afectado por el fenómeno del Niño, que causa déficit de lluvias en las vertientes Pacíficas y el cual de acuerdo a la Organización Meteorológica Mundial (2015) continuará en la segunda mitad del 2015 y se disipará en enero 2016.

Se conoce que existe una alternancia entre los fenómenos de La Niña y El Niño, que suceden en períodos que varían cada cinco a siete años, por lo que se espera que para 2016-2017 se presenten años lluviosos, ya que el último evento Niña se inició en abril 2010 y finalizó en febrero del 2012.

Esto repercutirá en la dinámica del desarrollo del ojo de gallo y de la roya; probablemente se verá un aumento de la primera y una disminución de la segunda, sobre todo en zonas situadas por encima de los 1 000msnm. Por ello, es de vital importancia tomar medidas preventivas desde ahora, para tratar de evitar altos niveles de enfermedad, altos costos de producción y elevadas pérdidas de cosecha.

Aunque las lluvias fueron atípicas en los años de estudio, se garantizó la presencia de inóculo inicial ya que se cuantificó enfermedad en todos los años; sin embargo, no se logró recuperar inóculo a partir de suelo ni hojarasca en muestreos detallados en zonas con niveles de enfermedad importante, esto aunado a que en la finca que se cuantificó la menor cantidad de lesiones viejas (inóculo residual) fue la que presentó mayor cantidad de lesiones nuevas (Cuadro 2.2) parece indicar que el patógeno no es capaz de vivir por períodos prolongados en estos sustratos.

Es decir, ni el suelo ni la hojarasca están comportándose como medios de sobrevivencia del patógeno y que, hay otras fuentes de inóculo primario además de las lesiones del año anterior. Esto podría estar relacionado con la cantidad de vegetación acompañante que presenta síntomas y signos, la cual podría estar aumentando la dimensión del inóculo primario, de esta forma las magnitudes del inóculo residual y el primario serían diferentes, siendo que el primario es mayor debido al aporte de las arvenses y los árboles de sombra.

Los resultados encontrados en el ensayo de remoción de hojarasca e inóculo primario, confirman los hallazgos de los muestreos; ya que bajo el supuesto de que *M. citricolor* tiene

un hábito de vida saprófito y descomponedor de hojarasca, se debió encontrar niveles más bajos de enfermedad en los tratamientos de remoción de hojarasca; sin embargo en los dos años de estudio fueron los tratamientos sin hojarasca los que desarrollaron mayor enfermedad en términos absolutos. Lo que sugiere que la hojarasca no tiene un rol importante como fuente de inóculo del ojo de gallo.

Lo anterior confirma las consideraciones hechas por Luttrell (1974) y por Rayner *et al.* (1985), los cuales indican que *M. citricolor* se comporta como un parásito hemibiótrofo o como un necrótrofo típico y no como la mayoría de las especies de *Mycena* que son saprófitas y pueden desarrollarse en hojas y madera en descomposición, como es el caso de *M. galopus* un descomponedor de hojas de roble, que puede permanecer en la hojarasca hasta por dos años y su micelio puede abarcar el 80% de ella (Hibbett y Thorn 2001, Moncalvo *et al.* 2002, Cannon y Kirk 2007, Webster y Weber 2007, Mycobank 2015).

Sin embargo, el hongo puede mantenerse en la hojarasca en períodos de alta humedad relativa, sobretodo en su forma sexual. Al respecto, Carvajal (1939a), Dennis (1950) y Buller (1958) indican que los basidiocarpos pueden ser observados en hojas de diferentes especies vegetales caídas y en descomposición sobre el suelo, tanto en el bosque como en cultivos de cafeto; mientras que los geminíferos se presentan sobre lesiones en hojas adheridas a la planta.

Parece que la producción de estos basidiomas es dependiente de la actividad de hongos saprófitos como *P. oxalicum*, *P. palitans*, *P. cyclopium*, *P. brevi-compactum*, *P. viridicatum*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. y *Phycomyces blakesleanus* ya que la producción del estado perfecto en cultivo artificial es baja o nula en muchos aislamientos, pero puede ser aumentada al co-cultivarlos con algunos de los hongos citados (Salas y Hancock 1972, Wang 1988).

Es muy probable que en las condiciones del piso del cafetal al finalizar los meses de mayor precipitación (setiembre y octubre) las poblaciones de hongos saprófitos se vean incrementadas por los altos porcentajes de humedad relativa y esto estimule la formación del morfo sexual de *M. citricolor* en la hojarasca a partir de hojas enfermas.

Sin embargo, de acuerdo a los resultados de esta investigación, aparentemente, no es capaz de sobrevivir en tejido en descomposición por largos períodos ni en períodos secos. No se

conoce el tiempo que puede mantenerse en estos sustratos, pero de acuerdo a observaciones hechas por los productores es menor de una semana, incluso algunos hablan de 3 días, por lo que es improbable que se pueda mantener en la capa de hojarasca durante el verano, en cualquiera de sus morfos, ya que el organismo según su biología, requiere de un sustrato hidratado para mantenerse vivo.

Se debe retomar en este punto que los años durante los cuales se realizó esta investigación fueron “secos” y esto pudo influenciar en una forma no cuantificable las interacciones patosistema-ambiente-ecosistema, ya de por sí complejas.

En ninguno de los años de estudio se dieron las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad, ni se cumplió con al menos 400mm de lluvia en tres semanas consecutivas, sin embargo, en el 2014 se notó un efecto del inóculo primario sobre la epidemia, ya que se registraron valores más elevados de precipitación anual (1 996mm en 2014 contra 1 527mm en 2013) y más cercanos al valor de lluvia acumulada (327mm en 2014 versus 282mm en 2013) en los meses de setiembre y octubre.

Retomando el efecto de la remoción de la hojarasca, que incluía eliminación de los residuos de poda, parece que está más relacionado al impacto en el vigor de la planta que a la cantidad de inóculo que pueda existir en ella, así parece afectar de forma negativa el desarrollo de las plantas, ya que aunque las condiciones no fueron conducentes para la enfermedad, si fueron apropiadas para el adecuado desarrollo del cultivo. ICAFE (2011) y Jiménez (2013) mencionan que la planta requiere una temperatura promedio anual entre los 17 a 25°C y lluvias en un rango ideal entre 1500 y 2000 mm, condiciones que se presentaron durante los años 2013 y 2014; sin embargo se cuantificó menor porcentaje de crecimiento acumulado en las plantas que tuvieron la mayor cantidad de enfermedad, aunque como se mencionó no superó el 25% en ninguno de los años, razón por la cual se debió utilizar una corrección del parámetro  $y_{max}$  para poder analizar adecuadamente las epidemias.

La importancia de la arborización y la presencia de una capa o “mulch” orgánico sobre el piso del cafetal ha sido documentada ampliamente, así se sabe que representan una estrategia para reducir las consecuencias de la variabilidad del clima. Por ejemplo, Beer *et al.* (1998) dicen que en los sistemas agroforestales, los árboles o arbustos de raíces profundas, aumentan

la disponibilidad y el reciclaje de los nutrientes, la fijación biológica de N, aumentan la cantidad de materia orgánica a través de hojarasca y residuos de poda, los cuales a su vez reducen el impacto de las gotas de la lluvia, la velocidad de escorrentía y la erosión, mejoran la estructura, el contenido de N y la retención de nutrientes en el suelo.

Otros beneficios del asocio de café con árboles son mayor productividad, mayor cantidad y calidad de granos (mayor peso fresco), mejores propiedades organolépticas, mayor proporción de café pergamino oro, mejor estado vegetativo general de las plantas, menor incidencia de malezas, menores porcentajes de frutos chasparreados, quemados o momificados. También, se han reportado menores niveles de incidencia de roya y menores niveles poblacionales de *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. (Araya 1994, Samayoa y Sánchez 2000, Muschler 2001, Romero 2006).

Por lo que, la presencia de árboles de sombra con poda adecuada, así como el mantenimiento de hojarasca en el piso del cafetal, se puede considerar una estrategia de manejo ecológicamente sostenible e integral. De hecho, antes de la década de 1950, cuando se afianzó el combate químico, las estrategias usadas fueron netamente culturales (Echandi y Segall 1958, Mora 1997).

Por otro lado, la eliminación del inóculo primario presente en la planta, sí tiene efecto sobre la cantidad de enfermedad final. Así en el experimento realizado en el 2014, se notó que las plantas con eliminación del follaje enfermo a inicios de la estación lluviosa (junio) fueron los que en promedio presentaron menor porcentaje acumulado de enfermedad (incidencia y cantidad de lesiones) (Figura 3.14 y Figura 3.15), lo cual concuerda con lo observado por Pla (1952). Sin embargo, debido al elevado costo en mano de obra y tiempo requerido para realizarla no se recomienda su uso práctico.

Con base en estos hallazgos, se refuerza la idea de reducir el inóculo primario con el fin de disminuir la enfermedad total y su tasa de infección aparente ( $r$ ). Aunque en este estudio, se encontraron valores más altos de la tasa de infección aparente que los reportados previamente, 0,015 unidades por día por Wang y Arauz (1999) y 0,004 unidades por día por Vargas (2004).

En las epidemias desarrolladas en el 2013 las tasas son prácticamente iguales, con un valor aproximado a 0,04 unidades por día; mientras que para el segundo año, los tratamientos a los que se les eliminó el inóculo inicial mostraron valores más elevados, alrededor de 0,05 unidades por día, situación que puede estar explicada por el hecho de que la eliminación de follaje al inicio de la estación perjudicó el desarrollo de las bandolas, predisponiendo a la enfermedad.

Se debe tomar en cuenta que en estos tratamientos se realizó defoliación manual en la planta completa de todas las hojas con solo presentar una lesión, aunque solo se evaluaron 5 bandolas por planta. Así, la defoliación manual cumplió con el objetivo de eliminar el inóculo existente, pero también provocó estrés en las plantas por la eliminación de fuentes de fotoasimilados y sustancias de defensa. Situación que, probablemente, influyó en que la enfermedad tuviera una mayor velocidad de desarrollo.

Como ya se ha mencionado, Wang y Arauz (1999), así como Mora y Vargas (1999) recomiendan una “aplicación veranera” de fungicidas como una estrategia de disminución de inóculo inicial, bajo el supuesto de que el inóculo residual es sinónimo de inóculo inicial; sin embargo en la investigación realizada por Chaves (2013) la aplicación de fungicidas sistémicos a base de triazoles, que son los más efectivos hasta el momento, no logró retardar la enfermedad en el invierno.

Lo anterior permite establecer varias hipótesis para explicar lo ocurrido; primero, que el inóculo residual no es la fuente de inóculo más importante para el inicio de la epidemia; segundo, que la magnitud de lo que tradicionalmente se ha denominado inóculo residual (las lesiones remanentes en las hojas al final del ciclo del año “n-1”) es diferente a la magnitud del inóculo primario, conceptualizado como todo inóculo capaz de producir infección al inicio del año “n”; en otras palabras, el posible inóculo presente en las hojas viejas es solo un componente de la totalidad del inóculo que inicia la epidemia, el cual puede tener otros elementos, tales como, inóculo procedente de arvenses y árboles de sombra.

Un elemento que se hace importante de mencionar es que durante esta investigación no fue posible aislar a *M. citricolor* a partir de lesiones del año “n-1”, lo que hace pensar que estas lesiones más que inactivas están muertas, por lo que no están sumando a la carga de inóculo

para el inicio de nuevas infecciones. Esto es una posible razón por la que Chaves (2013) no observó efectos con las aplicaciones químicas a este tipo de lesiones, porque estas realmente no están contribuyendo de manera significativa al avance de la epidemia.

Si bien este autor documentó viabilidad de las lesiones, no indica con claridad la apariencia de las mismas, siendo que aunque hayan sido colectadas de hojas del año “n-1”, pueden ser lesiones del año “n” de infecciones tempranas, por lo que no se conoce con claridad el tipo de lesiones a las que hace referencia.

Otra estrategia que se ha mencionado para el manejo de la enfermedad es la aplicación de controladores biológicos, Arroyo (1975), Vargas (1984), Porras (2000) y Ojeda y Suèscom (2012) reportan en sus investigaciones efectos *in vitro* y en campo de aislamientos de *Trichoderma* sp. y *T. harzianum* e indican que *Trichoderma* tiene la capacidad de establecerse dentro del tejido necrótico de la lesión y actuar como micoparásito sobre micelio y geminíferos de *M. citricolor*, además de la posibilidad de utilizarlos en forma combianda con aplicaciones de cobre.

Sin embargo, en esta investigación no fue posible hallar diferencias estadísticas entre tratamientos, posiblemente por la baja cantidad de bloques utilizados para la prueba. Aunque, el tratamiento químico fue el que presentó la menor ABCDL, 643 contra 1 695 y 2 473 en los tratamientos de aplicación de metabolitos al suelo/hojarasca y aspersión al follaje, en ese orden.

Los tratamientos de aplicación al follaje (químico y biológico) se mantuvieron muy similares cuando las condiciones de lluvia fueron menores a 300 mm, cuando la precipitación aumentó lo hizo también la cantidad de lesiones presentes en el tratamiento de aspersión de metabolitos al follaje, mostrando relación con el aumento de las condiciones ambientales favorables al desarrollo de la enfermedad, un comportamiento similar fue observado por Mora (1987), Calvo (1989) y Quesada (1996) al trabajar con bacterias antagonistas, estas investigadoras encontraron resultados positivos en condiciones de baja presión de inóculo y al inicio del período lluvioso.

Lo que sugiere que estas tácticas de manejo, deben ser netamente preventivas y podrían ser una herramienta útil en años “secos”, en aplicaciones “veraneras” y/o en años y sitios con baja presión de inóculo

Sin embargo, en años con precipitaciones normales o superiores al promedio, la aplicación de mayores volúmenes de agua al follaje pueden provocar efectos negativos, como los observados en esta investigación, donde la curva de desarrollo de las lesiones fue más alta cuando se realizó la aplicación de metabolitos al follaje, ya que maximiza las condiciones favorables para la enfermedad al propiciarse mayores períodos de mojadura foliar y porcentajes de humedad relativa, como se determinó en este estudio y había sido reportado por otros investigadores, algunos de los más recientes, Steaver *et al.* (2001), Vargas (2004), Avelino *et al.* (2007), Barquero (2012).

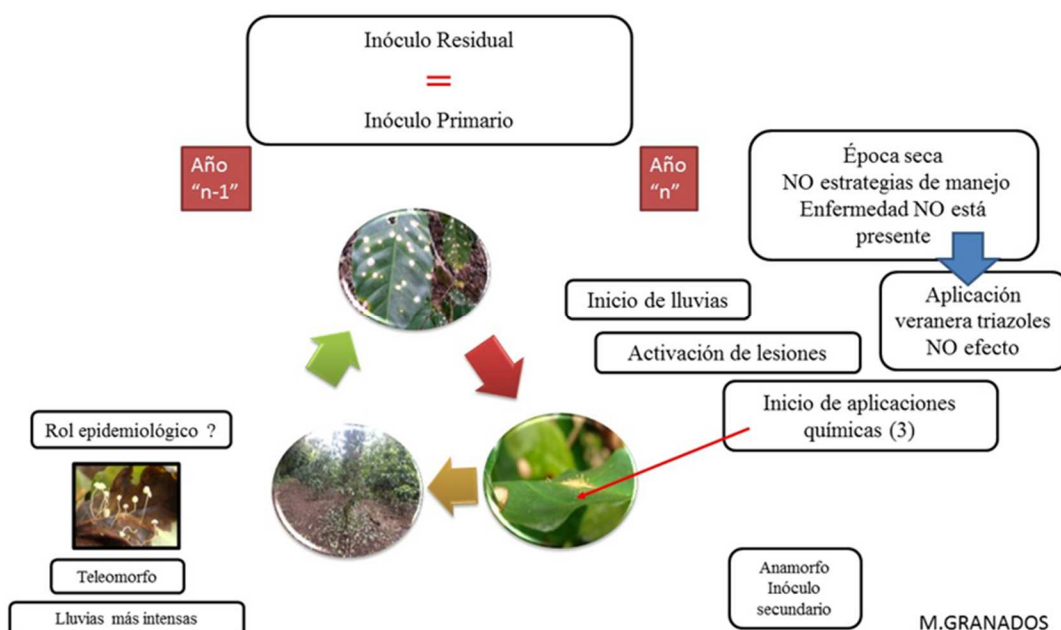
De acuerdo a todo lo dicho, es necesario que las estrategias de manejo sean diseñadas tomando en cuenta no solamente el nivel de inóculo residual, como ha sido conceptualizado hasta el momento, sino concibiendo la posibilidad de que el inóculo inicial no es exactamente igual en magnitud que el inóculo residual; que el primero puede estar siendo aumentado por la presencia de otras fuentes de inóculo distintas al café.

Además y de manera relevante, que estas fuentes están produciendo inóculo más patógeno que el inóculo presente en el cultivo, por lo que se hace urgente manejar de forma apropiada y selectiva la vegetación acompañante, así como conocer el aporte en inóculo e infectividad de todas las posibles fuentes, ya sean arvenses, árboles de sombra u otras variedades de café presentes en la plantación.

Entonces, con base en los resultados obtenidos se propone una nueva estrategia de manejo para el ojo de gallo en cafeto, la cual pretende ser más integral y sostenible, basada en el conocimiento de la diversidad en fuentes de inóculo halladas, así como en su patogenicidad diferencial al cafeto variedad Caturra. En las figuras 5.1 y 5.2 se resumen las estrategias de manejo convencional y la propuesta en este estudio.

Se distingue entre la magnitud del inóculo residual y primario, por lo que la estrategia se fundamenta en el manejo selectivo de las arvenses en la época seca para disminuir el nivel del inóculo inicial y por lo tanto el desarrollo de la epidemia. Así, se sugiere iniciar de forma

preventiva el combate del ojo de gallo desde finales del año “n-1” con la utilización de una táctica biológica, aplicaciones de antagonistas como *Trichoderma*, aplicaciones de bioles o téis de compost, para reducir la carga de inóculo que queda al final del ciclo. No se recomienda la aplicación de fungicidas, ya que los triazoles pueden contaminar el grano listo para la cosecha.



**Figura 5.1.** Diagrama del ciclo epidemiológico y el manejo convencional del ojo de gallo en café.

Al inicio del verano se sugiere la eliminación de arvenses que ya se ha comprobado son fuentes de inóculo de la enfermedad, sobretodo si estas se encuentran en micrositios con sombra de árboles hospederos o en lugares de la finca con presencia de catimores o variedades más susceptibles, para evitar ciclos “escondidos” de la epidemia, que permiten la sobrevivencia y perpetúan el inóculo.

Con respecto a los cultivares se sugiere valorar la pertinencia de conservar aquellos que se conoce son susceptibles, ya que estos contribuyen a aumentar la magnitud del inóculo inicial por permitir ciclos de la enfermedad aún en condiciones de verano; especialmente si se



ubican en zonas de las fincas cercanas a fuentes de agua, a bordes de montaña, si no se ha realizado raleo de malezas o si no se les realiza la practica de la deshija.

Siempre que se trate de decidir la conveniencia del uso de variedades particulares se debe tomar en cuenta el patosistema que se desea manejar. Ya que como se dijo antes si el problema es ojo de gallo serán unas variedades las adecuadas, pero si se trata de roya, son variedades diferentes las que debemos considerar como apropiadas.

En este punto, se debe anotar que existen tendencias en el uso de mezclas de variedades, sobretodo en el tema de manejo agroecológico u orgánico de la roya, ya que en el escenario de una epidemia como la del 2012-2013 un cultivo mixto le permite mayor resiliencia al sistema.

Siguiendo con el tema de vegetación acompañante, se sugiere el manejo de árboles voluntarios en medio del cafetal, por ejemplo, aguacate, dama, vainillo, higuerilla, entre otros que pueden estar también aumentando el nivel de inóculo primario.

Con respecto al manejo de la vegetación, ya sean árboles o arvenses, se debe tener especial cuidado en la estrategia que se utilice, ya que de acuerdo a muchos productores no es recomendable el uso de herbicidas, sobretodo de aquellos a base de glifosato, porque provocan efectos fisiológicos crónicos perjudiciales para el cultivo.

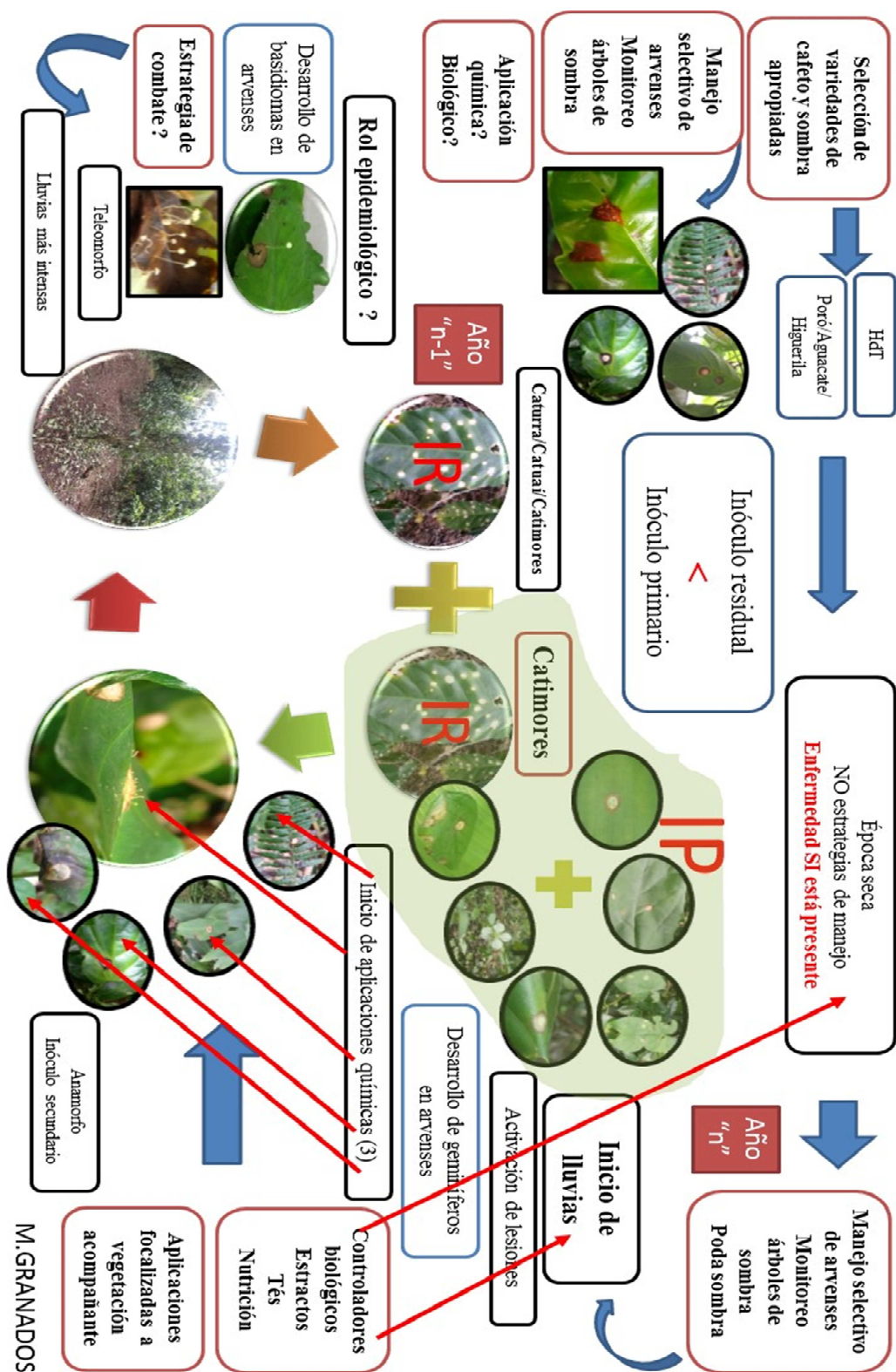
Ya en el invierno, se sugiere mantener la estrategia convencional con la diferencia de incluir en las aplicaciones de fungicidas a la vegetación acompañante, para controlar el inóculo secundario que se pueda estar produciendo en ellas y que puede ser dispersado al cultivo por la lluvia, insectos, pequeños mamíferos y aves, entre otros vectores.

No se deben dejar de lado las tácticas culturales que se han sugerido desde hace más de 70 años, como manejo de densidad de siembra, que involucra evitar sembrar muchos ejes por punto de siembra, cortas distancias entre surcos, puntos de siembra muy juntos, manejo de sombra, deshija y podas adecuadas. Además, las plantas se deben mantener con una nutrición adecuada, evitando deficiencias de calcio y magnesio, elementos que intevienen en el mecanismo de patogenicidad de *M.citricolor*. No se puede olvidar mantener los niveles de

bases adecuados en el suelo, para evitar condiciones de acidez que dañan el sistema radical y predisponen a las plantas al ataque de cualquier patógeno u oportunista.

Para finalizar, si se desea mantener una biodiversidad en el cafetal sin riesgos de aumento en la enfermedad, se debe entender que, como lo menciona Sileshi *et al.* (2008), existe una interacción particular en cada sistema agroforestal multiestrato que puede ser detrimental o benéfica en términos de plagas o incidencia de enfermedades y que esa interacción es altamente dependiente de factores complejos como las prácticas de manejo, tipos de plagas y enfermedades, el clima, el suelo, entre otras.

Además dicen que, aumentando la biodiversidad se afecta de forma impredecible el sistema, debido a su complejidad y a las funciones de las especies individuales que interactúan, las cuales juegan un papel en la afectación de cualquier proceso. Así una alteración en la diversidad puede alterar la tasa de algún proceso en el sistema. Esto se debe entender para poder diseñar estrategias particulares a cada finca, dependiendo de su diversidad biológica, sus prácticas de manejo, las variedades presentes y sobretodo la filosofía del productor.



**Figura 5.2.** Diagrama del ciclo epidemiológico y el manejo propuestos para ojo de gallo en café de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación.

## Literatura citada

- Anzueto F. 2013. Variedades de café resistentes a la roya. Asociación Nacional de Café (ANACAFE). Consultado 02 jun. 2015. Disponible en [http://www.anacafe.org/glifos/index.php/Variedades\\_resistentes\\_a\\_roya](http://www.anacafe.org/glifos/index.php/Variedades_resistentes_a_roya)
- Araya M. 1994. Distribución y niveles poblacionales de *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. en ocho cantones productores de café en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 18:183–187.
- Arnold G.R.W. 1986. Lista de hongos fitopatógenos de Cuba. Ed. Científico-Técnica. La Habana. p41. *Fuente original*: De la Iglesia D, Cascaret L.2000. Especies hospedantes de *Mycena citricolor* (Berk., et Curt.) Sacc. en plantaciones de cafeto (*Coffea arabica* L.). *Fitosanidad*. Vol. 4 (1-2):21-22.
- Arroyo, T. 1975. Control biológico del ojo de gallo en el café causado por *Mycena citricolor* (Berk & Curt) Sacc. en época seca. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 65p.
- Avelino J, Cabut, S. Barboza, B; Barquero, M; Alfaro, R; Esquivel, C; Durand, JF; Cilas, C. 2007. Topography and crop management are key factors for the development of american leaf spot epidemics on coffee in Costa Rica. *Phytopathology* 97: 1532-1542.
- Barquero, M. 2010a. Más de 75.000 fanegas de café se perdieron por ‘ojo de gallo’ (en línea). *La Nación*. Consultado 13 may. 2011. Disponible en <http://www.nacion.com/2010-10-23/Economia/NotasSecundarias/Economia2564575.aspx>
- Barquero, M. 2010b. Cafetaleros perdieron 12% de cosecha por lluvia y plagas. (en línea). *La Nación*. Consultado 13 may. 2011. Disponible en <http://www.nacion.com/2010-12-17/Economia/NotaPrincipal/Economia2624844.aspx>
- Barquero M. 2012. Sistema de alerta temprana para el ojo de gallo. *Revista Informativa Icafe*. No. 2 Año 6. p.2-4.
- Beer J, Muschler R, Kass D, Somarriba E. 1998. Shade management in coffee and cacao plantations. *Agroforestry Systems* 38: 139-164.
- Buller R. 1958. *Omphalia flavida*, a gemmiferous and luminous leaf-spot fungus. *In* *Researches on fungi*. London. London, New York. Vol.6: 397-442.
- Calvo, S. 1989. Combate biológico de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) del cafeto mediante bacterias antagonistas en el campo. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 47p.
- Carvajal F. 1939a. Ojo de gallo (*Omphalia flavida*). *Revista del Instituto de Defensa del Café de Costa Rica*. Tomo 7. No.52. p. 535-549.
- Carvajal F. 1939b. Ojo de gallo (*Omphalia flavida*): Segunda parte, la forma perfecta del hongo “*Omphalia flavida*” creciendo libremente en la naturaleza como parásito sobre plantas vivas, en el distrito cafetalero del Zapote (Prov. de San José, CR). *Revista del Instituto de Defensa del Café de Costa Rica*. Tomo 7. No.52. p. 550-565.

- Cannon PF, Kirk PM. 2007. Fungal families of the world. CABI. 456 p.
- Chaves, R. 2013. Determinación del efecto de aplicaciones de fungicidas en verano con el fin de disminuir el inóculo residual de ojo de gallo (*Mycena citricolor* Berk. Y Curt) Sacc. en el cultivo de cafeto (*Coffea arabica*). Tesis Lic. UCR. Costa Rica. 46p.
- DaMatta, F; Rodríguez, N. 2007. Producción sostenible de cafetales en sistemas agroforestales del Neotrópico: una visión agronómica y ecofisiológica. Agronomía Colombiana Vol.25 (1): 113-123.
- De la Iglesia D, Cascaret L. 2000. Especies hospedantes de *Mycena citricolor* (Berk., et Curt.) Sacc. en plantaciones de cafeto (*Coffea arabica* L.). Fitosanidad. Vol. 4 (1-2):21-22.
- Dennis R.W.G. 1950. An Earlier Name for *Omphalia flavida* Maubl. and Rangel. Kew Bulletin, Vol. 5(3):434.
- ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). 2011. Caficultores se preparan ante el cambio climático. Consultado 17 may. 2011. Disponible en [http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe\\_cambio\\_climatico/CLIMA%20CAFE%20-%20110211.pdf](http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe_cambio_climatico/CLIMA%20CAFE%20-%20110211.pdf)
- \_\_\_\_\_. 2012. Café de Costa Rica. Material audiovisual preparado por el ICAFE para la Conferencia Internacional en Ciencias del Café, ASIC Costa Rica. 11 al 16 de nov.
- IMN (Instituto Meteorológico Nacional). 2015. El Niño y la Niña. (en línea). Consultado 3 set. 2015. Disponible en <http://www.imn.ac.cr/publicaciones/index.html>
- Hibbett D, Thorn R. 2001. Basidiomicotina: holobasidiomicetes. In: The mycota VII Part B. Systematics and evolution. McLaughlin, McLaughlin, Lemke. eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 121-168.
- Jiménez, A. 2013. El café en Costa Rica: gran modelador del costarricense. San José, Costa Rica. Editorial UCR. 692 p.
- Luttrell E. S. 1974. Parasitism of Fungi on Vascular Plants. Mycologia, Vol. 66 (1): 1-15.
- Maublanc M.M, E Rangel. 1914. Le *Stilbum flavidum* Cooke, forme avortée de l'*Omphalia flavida* n. sp. Bulletin Trimestral de la Société Mycologique de France. pp. 41-47.
- Moncalvo J.M, Vilgalys R, Redhead S, Johnson J. E, James T, Aime M.C, Hofstetter V, Verduin S, Larsson E, Baroni T.J, Thorn G, Jacobsson S, Clemencon H, Miller O.K. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. Molecular Phylogenetics and Evolution 23: 357–400.
- Montenegro, J. 2011. Cambio climático y la actividad cafetalera en Costa Rica. Presentación Power Point. Consultado 17 may. 2011. Disponible en [http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe\\_cambio\\_climatico/ICAFE-Marzo10-2011-F.pdf](http://www.icafe.go.cr/icafe/anuncios/cafe_cambio_climatico/ICAFE-Marzo10-2011-F.pdf)

- Mora, F. 1987. Combate biológico de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) Berk. & Curt Sacc en café mediante bacterias antagonistas. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 58p.
- Mora, O. 1997. Estudio del efecto del pH alcalino en la atomización para el control del ojo de gallo (*Mycena citricolor*). In XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura. IICA-PROMECAFE. EDITORAMA. p.393-399.
- Muschler, R. 2001. Shade improves coffee quality in a sub-optimal coffee-zone of Costa Rica. *Agroforestry systems*. 85:131–139.
- Mycobank. 2015. *Mycena citricolor*. (en línea). Consultado 06 jun.2015. Disponible en <http://www.mycobank.org>
- Ojeda K, Suès cum J. 2012. Evaluación de cinco cepas de hongos nativos como controladores biológicos de la enfermedad “Ojo de Pollo” (*Mycena citricolor*) en café (*Coffea arabica*) en condiciones in vitro. Tesis Bach. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador. 68p.
- OMM (Organización Meteorológica Mundial). 2015. El Niño y la Niña hoy. (en línea). Consultado 3 set. 2015. Disponible en [https://www.wmo.int/media/sites/default/files/EL-NINO-LA-NINA-151120\\_es.pdf](https://www.wmo.int/media/sites/default/files/EL-NINO-LA-NINA-151120_es.pdf)
- Pacheco A. 2012. Epidemiología de la enfermedad ojo de gallo del café (*Coffea arabica*) causada por el hongo *Mycena citricolor* Berk & Curt en el área centro occidental de Guatemala, C.A. Tesis Lic. Universidad de San Carlos de Guatemala. 81p.
- Pla JL. 1952. Informe sobre deshoja manual del café. *Suelo Tico* 6(28):209-213.
- Plantwise Knowledge Bank. 2015. Distribution map of American leaf spot of coffee (*Mycena citricolor*) (en línea). Consultado: 02 jun. 2015. Disponible en <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap.aspx?speciesID=28017&dsID=35243&loc=global>
- Porras, A. 2000. Evaluación de la actividad in vitro del género *Hypocrea* contra 2 hongos fitopatógenos de importancia agrícola (*Fusarium* sp. y *Mycena citricolor*). Tesis Bach. Cartago, CR. ITCR. 97p.
- Quesada, D. 1996. Efecto del adherente y época de aplicación de una bacteria antagonista en el combate de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) Berk. & Curt Sacc. Tesis Lic. San José, CR. UCR. 41p.
- Rayner A.D.M, Watling R, Frankland J.C. 1985. Resource relation: an overview. In *Developmental Biology of Higher Fungi*. British Mycological Society. D. Moore, L.A. Casselton, D.A. Wood, J.C. Frankland eds. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p.1-40.
- Romero A. 2006. Aporte de biomasa y reciclaje de nutrientes en seis sistemas agroforestales de café (*Coffea arabica* var. Caturra), con tres niveles de manejo. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 128 p.
- Salas J.A, Hancock J.G. 1972. Production of the Perfect Stage of *Mycena citricolor* (Berk. and Curt.) Sacc. *HILGARDIA* 41(9): 213-234

- Samayoa, JO; Sánchez, V. 2000. Importancia de la sombra en la incidencia de enfermedades en café orgánico y convencional en Paraíso, Costa Rica. *Agroforestería en las Américas*. 7(26): 34–36.
- Santacreo R. 2001. Variedades y mejoramiento genético del café. *In* Manual de caficultura. 3ed. IHCAFE. Tegucigalpa M.D.C., Honduras. p. 23-40.
- Sequeira, L. 1958. The host range of *Mycena citricolor* (Berk and Curt) Sacc. *Turrialba* Vol. 8(4): 136-147.
- Sileshi, G; Schroth, G; Rao, M; Girma, H. 2008. Weeds, disease, insect pests and tri-trophic interactions in tropical agroforestry. *In*: Batish, D; Kohli, R; Jose, S; Singh, H. *Ecological basis of agroforestry*. CRC Press. Taylor y Francis Group. Boca Raton, FL. p. 73-94.
- Staver C; Guharay, F; Monterroso, D; Muschler, RG. 2001. Designing pest-suppressive multistrata perennial crop systems: shade-grown coffee in Central America. *Agroforestry Systems* 53: 151–170.
- Sequeira, L. 1958. The host range of *Mycena citricolor* (Berk and Curt) Sacc. *Turrialba* Vol. 8(4): 136-147.
- Urtiaga R. 1986. Índice de enfermedades de Venezuela y Cuba. Lara. Venezuela. p.202. *Fuente original*: De la Iglesia D, Cascaret L.2000. Especies hospedantes de *Mycena citricolor* (Berk., et Curt.) Sacc. en plantaciones de cafeto (*Coffea arabica* L.). *Fitosanidad*. Vol. 4 (1-2):21-22.
- Vargas LG, Mora J. 1999. Manejo químico del inóculo residual del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en café (*Coffea arabica*). *In* “Memoria” XI Congreso Agronómico /IV Congreso Nacional de Fitopatología. p. 67.
- Vargas, LG. 2004. Bases epidemiológicas para el desarrollo de un sistema de pronóstico en ojo de gallo (*Mycena citricolor* Berk. y Curt) Sacc. en cafeto (*Coffea arabica*). Tesis M.Sc. San José, CR. UCR. 118p.
- \_\_\_\_\_, Arauz, LF. 1999. Aplicación de principios epidemiológicos para el combate de ojo de gallo en cafeto. *In* “Memoria” XI Congreso Agronómico /IV Congreso Nacional de Fitopatología. p. 9-12.
- Wang, A.1988. Variation in *Mycena citricolor* on coffee en Costa Rica. Tesis M.Sc. Edmonton, Alberta. 100p.
- Webster J, Weber R. 2007. *Introduction to Fungi*. 3ed. Cambridge University Press. 701p.

## Conclusiones generales

---

1. *M. citricolor* no es capaz de sobrevivir largos períodos en suelo ni hojarasca.
2. La hojarasca presente en el piso del cafetal no es una fuente de inóculo primario para el ojo de gallo.
3. La eliminación de la hojarasca se relaciona con mayores valores absolutos de la enfermedad.
4. Las lesiones del año anterior no son la única fuente de inóculo primario del ojo de gallo.
5. El inóculo primario tiene efecto sobre el desarrollo del ojo de gallo aún bajo condiciones conducentes mínimas para la enfermedad.
6. Existe diferencia en la patogenicidad de cepas de *M. citricolor* recuperadas de diferentes variedades de café.
7. El inóculo proveniente de la variedad Costa Rica 95 (Catimor) es más patogénico que el inóculo recuperado de la variedad Caturra.
8. Existe diferencia en la patogenicidad de cepas de *M. citricolor* recuperadas de hospederos diferentes al café, como *Anredera cordifolia* y *Bryophyllum calycinum*.
9. La patogenicidad de las cepas de *M. citricolor* se disminuye *in vitro*.



## Recomendaciones generales

---

1. Continuar con la búsqueda de fuentes de inóculo de *M. citricolor* en la zona de Los Santos y en las otras regiones cafetaleras de Costa Rica.
2. Realizar los bioensayos de inoculación para determinación de patogenicidad solamente con inóculo proveniente directamente de campo.
3. Cuantificar la patogenicidad sobre Caturra y Catuaí del inóculo proveniente de variedades derivadas del Híbrido de Timor, como la variedad OBATÁ.
4. No se recomienda ni la remoción de hojarasca ni de hojas enfermas, ya que podrían retardar el crecimiento de la planta y la predisponer a la enfermedad.
5. Evaluar el efecto de metabolitos secundarios de *Trichoderma* por medio de variables como crecimiento y producción del hospedero.
6. Realizar análisis por otros medios, como los moleculares, para descartar la presencia del inóculo de *M. citricolor* en suelo y hojarasca.
7. Realizar análisis moleculares para determinar la variabilidad de la población de *M.citricolor* presente tanto en cafeto como en vegetación acompañante en la zona de Los Santos.

Anexo 1.

## Análisis de la varianza Remoción 2013

### HOJAS ENFERMAS\_13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
HOJAS ENFERMAS 13	24	0,41	0,00	86,10

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	6904,83	13	531,14	0,54	0,8536	
Hojarasca	0,17	1	0,17	3,0E-04	0,9868	(Hojarasca*Bloque)
Hojarasca	0,00	0	0,00	sd	sd	
Bloque	3561,00	5	712,20	0,72	0,6226	
Inoc. Res	48,17	1	48,17	0,05	0,8297	
Hojarasca*Bloque	2772,83	5	554,57	0,56	0,7279	
Hojarasca*Inoc. Res	522,67	1	522,67	0,53	0,4836	
Error	9877,17	10	987,72			
Total	16782,00	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=24,71341

Error: 554,5667 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
2	36,42	12	6,80 A
1	36,58	12	6,80 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=24,71341

Error: 554,5667 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
2	36,42	12	6,80 A
1	36,58	12	6,80 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=28,58793

Error: 987,7167 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.
1	35,08	12	9,56 A
2	37,92	12	9,56 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=70,02585

Error: 987,7167 gl: 10

Hojarasca	Bloque	Medias	n	E.E.
2	3	15,50	2	23,43 A
1	6	17,50	2	23,43 A
2	4	19,00	2	23,43 A
1	5	19,50	2	23,43 A
2	6	26,00	2	23,43 A
1	4	29,00	2	23,43 A
1	2	46,00	2	23,43 A
1	3	47,00	2	23,43 A
2	1	50,00	2	23,43 A
2	2	50,00	2	23,43 A
2	5	58,00	2	23,43 A
1	1	60,50	2	23,43 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=40,42944

Error: 987,7167 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.
2	1	30,33	6	13,52 A
1	2	33,33	6	13,52 A
1	1	39,83	6	13,52 A
2	2	42,50	6	13,52 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### LESIONES\_13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LESIONES_13	24	0,75	0,42	69,38

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	265564,17	13	20428,01	2,28	0,0990	
Hojarasca	28153,50	1	28153,50	2,96	0,1460	(Hojarasca*Bloque)
Hojarasca	0,00	0	0,00	sd	sd	
Bloque	187591,00	5	37518,20	4,18	0,0260	
Inoc. Res	192,67	1	192,67	0,02	0,8864	
Hojarasca*Bloque	47573,50	5	9514,70	1,06	0,4359	
Hojarasca*Inoc. Res	2053,50	1	2053,50	0,23	0,6426	
Error	89693,83	10	8969,38			
Total	355258,00	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=102,36542

Error: 9514,7000 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
1	102,25	12	28,16 A
2	170,75	12	28,16 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=102,36542

Error: 9514,7000 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
1	102,25	12	28,16 A
2	170,75	12	28,16 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=86,14852

Error: 8969,3833 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.
1	133,67	12	28,82 A
2	139,33	12	28,82 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=211,01993

Error: 8969,3833 gl: 10

Hojarasca	Bloque	Medias	n	E.E.
2	4	38,50	2	70,59 A
1	5	40,50	2	70,59 A
2	3	44,50	2	70,59 A
1	6	45,00	2	70,59 A
1	4	61,50	2	70,59 A
2	6	78,50	2	70,59 A
1	3	104,00	2	70,59 A
1	2	170,00	2	70,59 A B
1	1	192,50	2	70,59 A B
2	5	195,00	2	70,59 A B
2	2	322,50	2	70,59 B
2	1	345,50	2	70,59 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=121,83241

Error: 8969,3833 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
1	2	95,83	6	40,76	A
1	1	108,67	6	40,76	A
2	1	158,67	6	40,76	A
2	2	182,83	6	40,76	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### GEMAS\_13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
GEMAS_13	24	0,55	0,00	186,57

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	912844,54	13	70218,81	0,96	0,5394	
Hojarasca	185680,04	1	185680,04	2,75	0,1579	(Hojarasca*Bloque)
Hojarasca	0,00	0	0,00	sd	sd	
Bloque	368880,21	5	73776,04	1,01	0,4625	
Inoc. Res	17550,04	1	17550,04	0,24	0,6354	
Hojarasca*Bloque	337108,21	5	67421,64	0,92	0,5071	
Hojarasca*Inoc. Res	3626,04	1	3626,04	0,05	0,8286	
Error	733929,42	10	73392,94			
Total	1646773,96	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=272,49303

Error: 67421,6417 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	57,25	12	74,96	A
2	233,17	12	74,96	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=272,49303

Error: 67421,6417 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	57,25	12	74,96	A
2	233,17	12	74,96	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=246,43007

Error: 73392,9417 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
1	118,17	12	82,44	A
2	172,25	12	82,44	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=603,62792

Error: 73392,9417 gl: 10

Hojarasca	Bloque	Medias	n	E.E.	
1	5	0,00	2	201,93	A
2	4	1,00	2	201,93	A
1	4	17,00	2	201,93	A
1	6	33,50	2	201,93	A
2	3	52,50	2	201,93	A
1	3	56,50	2	201,93	A
2	6	61,50	2	201,93	A
1	1	77,00	2	201,93	A
1	2	159,50	2	201,93	A
2	2	200,50	2	201,93	A
2	5	421,00	2	201,93	A
2	1	662,50	2	201,93	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=348,50474

Error: 73392,9417 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.
1	1	42,50	6	116,58 A
1	2	72,00	6	116,58 A
2	1	193,83	6	116,58 A
2	2	272,50	6	116,58 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

LXht\_13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LXht_13	24	0,74	0,41	57,43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	11,10	13	0,85	2,23	0,1052	
Hojarasca	0,05	1	0,05	0,18	0,6889	(Hojarasca*Bloque)
Hojarasca	0,00	0	0,00	sd	sd	
Bloque	8,13	5	1,63	4,24	0,0249	
Inoc. Res	0,56	1	0,56	1,47	0,2538	
Hojarasca*Bloque	1,49	5	0,30	0,78	0,5877	
Hojarasca*Inoc. Res	0,86	1	0,86	2,25	0,1646	
Error	3,83	10	0,38			
Total	14,93	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,57300

Error: 0,2981 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
1	1,03	12	0,16 A
2	1,13	12	0,16 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,57300

Error: 0,2981 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
1	1,03	12	0,16 A
2	1,13	12	0,16 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,56326

Error: 0,3834 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.
1	0,93	12	0,19 A
2	1,23	12	0,19 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,37969

Error: 0,3834 gl: 10

Hojarasca	Bloque	Medias	n	E.E.
2	6	0,42	2	0,46 A
2	3	0,46	2	0,46 A B
1	5	0,47	2	0,46 A B
1	6	0,60	2	0,46 A B
1	4	0,61	2	0,46 A B
2	4	0,66	2	0,46 A B
1	3	1,15	2	0,46 A B C
2	5	1,20	2	0,46 A B C
2	2	1,49	2	0,46 A B C
1	2	1,54	2	0,46 A B C
1	1	1,81	2	0,46 B C
2	1	2,52	2	0,46 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,79656

Error: 0,3834 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	1	0,78	6	0,27	A
1	2	0,99	6	0,27	A
1	1	1,07	6	0,27	A
2	2	1,47	6	0,27	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

%lesiones con gemas\_13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
%lesiones con gemas_1324	1324	0,58	0,03	107,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	10206,64	13	785,131,06		0,4750	
Hojarasca	1060,55	1	1060,551,60		0,2614	(Hojarasca*Bloque)
Hojarasca	0,00	0	0,00	sd	sd	
Bloque	4933,64	5	986,731,33		0,3282	
Inoc. Res	892,85	1	892,851,20		0,2989	
Hojarasca*Bloque	3309,91	5	661,980,89		0,5227	
Hojarasca*Inoc. Res	9,69	1	9,690,01		0,9114	
Error	7438,36	10	743,84			
Total	17644,99	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=27,00093

Error: 661,9818 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	18,64	12	7,43	A
2	31,94	12	7,43	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=27,00093

Error: 661,9818 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	18,64	12	7,43	A
2	31,94	12	7,43	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=24,80876

Error: 743,8357 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
1	19,19	12	8,30	A
2	31,39	12	8,30	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=60,76880

Error: 743,8357 gl: 10

Hojarasca	Bloque	Medias	n	E.E.	
1	5	0,00	2	20,33	A
2	4	0,70	2	20,33	A
1	4	4,55	2	20,33	A
1	1	12,73	2	20,33	A
2	2	13,43	2	20,33	A
1	2	18,78	2	20,33	A
2	6	20,21	2	20,33	A
1	6	34,26	2	20,33	A
1	3	41,55	2	20,33	A
2	1	47,87	2	20,33	A
2	5	51,14	2	20,33	A
2	3	58,28	2	20,33	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=35,08488**

Error: 743,8357 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.
1	1	11,91	6	11,74 A
1	2	25,38	6	11,74 A
2	1	26,47	6	11,74 A
2	2	37,40	6	11,74 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**ABCPH\_Tt\_13**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCPH_Tt_13	24	0,69	0,29	49,75

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	13503536,11	13	1038733,55	1,73	0,1958	
Hojarasca	1024957,81	1	1024957,81	0,64	0,4602	(Hojarasca*Bloque)
Hojarasca	0,00	0	0,00	sd	sd	
Bloque	4412557,96	5	882511,59	1,47	0,2829	
Inoc. Res	25397,03	1	25397,03	0,04	0,8413	
Hojarasca*Bloque	8015292,39	5	1603058,48	2,66	0,0878	
Hojarasca*Inoc. Res	25330,92	1	25330,92	0,04	0,8415	
Error	6015639,02	10	601563,90			
Total	19519175,13	23				

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1328,71068**

Error: 1603058,4774 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
2	1352,44	12	365,50 A
1	1765,75	12	365,50 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1328,71068**

Error: 1603058,4774 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
2	1352,44	12	365,50 A
1	1765,75	12	365,50 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=705,51692**

Error: 601563,9018 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.
2	1526,57	12	236,01 A
1	1591,63	12	236,01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1728,15645**

Error: 601563,9018 gl: 10

Hojarasca	Bloque	Medias	n	E.E.
1	5	598,40	2	578,10 A
2	3	678,50	2	578,10 A B
1	4	961,18	2	578,10 A B C
1	6	1045,68	2	578,10 A B C
2	6	1145,30	2	578,10 A B C
2	1	1181,89	2	578,10 A B C
2	4	1457,31	2	578,10 A B C D
2	2	1636,00	2	578,10 A B C D
2	5	2015,65	2	578,10 A B C D
1	3	2328,69	2	578,10 B C D
1	1	2680,94	2	578,10 C D
1	2	2979,62	2	578,10 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=997,75159

Error: 601563,9018 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.
2	2	1352,40	6	333,77 A
2	1	1352,48	6	333,77 A
1	2	1700,74	6	333,77 A
1	1	1830,77	6	333,77 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

ABCPL\_Tt\_13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCPL_Tt_13	24	0,87	0,70	22,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	78,94	13	6,07	5,08	0,0072	
Hojarasca	0,04	1	0,04	0,01	0,9317	(Hojarasca*Bloque)
Hojarasca	0,00	0	0,00	sd	sd	
Bloque	50,46	5	10,09	8,45	0,0023	
Inoc. Res	1,5E-03	1	1,5E-03	1,2E-03	0,9728	
Hojarasca*Bloque	25,47	5	5,09	4,27	0,0245	
Hojarasca*Inoc. Res	2,97	1	2,97	2,48	0,1461	
Error	11,94	10	1,19			
Total	90,88	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,36861

Error: 5,0942 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
2	4,91	12	0,65 A
1	5,00	12	0,65 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,36861

Error: 5,0942 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
2	4,91	12	0,65 A
1	5,00	12	0,65 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,99408

Error: 1,1943 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.
2	4,95	12	0,33 A
1	4,96	12	0,33 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,43499

Error: 1,1943 gl: 10

Hojarasca	Bloque	Medias	n	E.E.			
1	5	2,58	2	0,81	A		
2	6	2,84	2	0,81	A		
1	4	2,96	2	0,81	A		
2	3	3,57	2	0,81	A	B	
1	6	3,73	2	0,81	A	B	C
2	4	3,86	2	0,81	A	B	C
2	5	5,76	2	0,81		B	C
2	2	6,08	2	0,81			C
1	2	6,67	2	0,81			D
1	1	6,84	2	0,81			D
1	3	7,20	2	0,81			D
2	1	7,37	2	0,81			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,40584**

Error: 1,1943 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	1	4,57	6	0,47	A
1	2	4,64	6	0,47	A
2	2	5,26	6	0,47	A
1	1	5,36	6	0,47	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### ABCPG\_T\_13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCPG_T_13	24	0,55	0,00	191,44

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	881392148,88	13	67799396,07	0,94	0,5500	
Hojarasca	174048590,04	1	174048590,04	3,12	0,1376	(Hojarasca*Bloque)
Hojarasca	0,00	0	0,00	sd	sd	
Bloque	402604222,71	5	80520844,54	1,12	0,4101	
Inoc. Res	21103126,04	1	21103126,04	0,29	0,6002	
Hojarasca*Bloque	278987169,71	5	55797433,94	0,77	0,5894	
Hojarasca*Inoc. Res	4649040,38	1	4649040,38	0,06	0,8046	
Error	720261588,08	10	72026158,81			
Total	1601653736,96	23				

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=7839,03954**

Error: 55797433,9417 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
1	1740,08	12	2156,34 A
2	7126,00	12	2156,34 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=7839,03954**

Error: 55797433,9417 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
1	1740,08	12	2156,34 A
2	7126,00	12	2156,34 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=7719,89999**

Error: 72026158,8083 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.
1	3495,33	12	2582,46 A
2	5370,75	12	2582,46 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=18909,81585**

Error: 72026158,8083 gl: 10

Hojarasca	Bloque	Medias	n	E.E.	
1	5	0,00	2	6325,70	A
2	4	28,00	2	6325,70	A
1	4	476,00	2	6325,70	A
1	6	588,00	2	6325,70	A
1	3	1155,00	2	6325,70	A
2	3	1190,00	2	6325,70	A
2	6	1487,50	2	6325,70	A
1	1	3503,50	2	6325,70	A
1	2	4718,00	2	6325,70	A
2	2	6856,50	2	6325,70	A
2	5	13016,50	2	6325,70	A
2	1	20177,50	2	6325,70	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=10917,58727

Error: 72026158,8083 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.
1	1	1242,50	6	3652,15 A
1	2	2237,67	6	3652,15 A
2	1	5748,17	6	3652,15 A
2	2	8503,83	6	3652,15 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

ABCP\_C\_Tt\_13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCP_C_Tt_13	24	0,54	0,00	0,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	0,0313	1	2,3E-03	0,91	0,5711	
Hojarasca	5,3E-04	1	5,3E-04	0,60	0,4723	(Hojarasca*Bloque)
Hojarasca	0,00	0	0,00	sd	sd	
Bloque	0,02	5	4,7E-03	1,83	0,1946	
Inoc. Res	2,0E-03	1	2,0E-03	0,78	0,3974	
Hojarasca*Bloque	4,4E-03	5	8,8E-04	0,34	0,8768	
Hojarasca*Inoc. Res	1,6E-05	1	1,6E-05	0,01	0,9388	
Error	0,0310		2,6E-03			
Total	0,0623					

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,03106

Error: 0,0009 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
2	7,46	12	0,01 A
1	7,47	12	0,01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,03106

Error: 0,0009 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.
2	7,46	12	0,01 A
1	7,47	12	0,01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,04612

Error: 0,0026 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.
1	7,45	12	0,02 A
2	7,47	12	0,02 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,11297

Error: 0,0026 gl: 10

Hojarasca	Bloque	Medias	n	E.E.
2	1	7,39	2	0,04 A
1	1	7,40	2	0,04 A
1	2	7,45	2	0,04 A B
2	6	7,46	2	0,04 A B
2	3	7,46	2	0,04 A B
1	4	7,47	2	0,04 A B
1	3	7,47	2	0,04 A B
2	4	7,47	2	0,04 A B
2	2	7,48	2	0,04 A B
2	5	7,49	2	0,04 A B
1	5	7,50	2	0,04 A B
1	6	7,52	2	0,04 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,06522

Error: 0,0026 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	1	7,45	6	0,02	A
1	1	7,46	6	0,02	A
2	2	7,47	6	0,02	A
1	2	7,48	6	0,02	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

ABCPD\_Tt\_13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCPD_Tt_13	24	0,65	0,21	25,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	192574,38	13	14813,41	1,46	0,2789	
Hojarasca	8279,40	1	8279,40	0,78	0,4185	(Hojarasca*Bloque)
Hojarasca	0,00	0	0,00	sd	sd	
Bloque	117300,10	5	23460,02	2,31	0,1220	
Inoc. Res	13469,15	1	13469,15	1,32	0,2765	
Hojarasca*Bloque	53309,13	5	10661,83	1,05	0,4416	
Hojarasca*Inoc. Res	216,60	1	216,60	0,02	0,8869	
Error	101677,93	10	10167,79			
Total	294252,31	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=108,36064

Error: 10661,8265 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
2	382,65	12	29,81	A
1	419,80	12	29,81	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=108,36064

Error: 10661,8265 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
2	382,65	12	29,81	A
1	419,80	12	29,81	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=91,72335

Error: 10167,7932 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
1	377,54	12	30,68	A
2	424,92	12	30,68	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=224,67540

Error: 10167,7932 gl: 10

Hojarasca	Bloque	Medias	n	E.E.	
2	1	269,12	2	75,16	A
2	3	273,95	2	75,16	A
2	2	315,65	2	75,16	A
1	1	348,19	2	75,16	A
1	5	373,69	2	75,16	A
2	5	410,83	2	75,16	A
1	4	428,50	2	75,16	A
1	2	438,24	2	75,16	A
1	3	445,89	2	75,16	A
2	4	447,13	2	75,16	A
1	6	484,29	2	75,16	A
2	6	579,24	2	75,16	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=129,71640

Error: 10167,7932 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	1	355,96	6	43,39	A
1	1	399,11	6	43,39	A
2	2	409,35	6	43,39	A
1	2	440,49	6	43,39	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### ABCPDOG\_Tt\_13

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCPDOG_Tt_13	24	0,57	0,01	55,70

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	1721319,24	13	132409,17	1,03	0,4937	
Hojarasca	41629,54	1	41629,54	0,17	0,7009	(Hojarasca*Bloque)
Hojarasca	0,00	0	0,00	sd	sd	
Bloque	182738,87	5	36547,77	0,28	0,9119	
Inoc. Res	232832,64	1	232832,64	1,80	0,2089	
Hojarasca*Bloque	1257076,97	5	251415,39	1,95	0,1729	
Hojarasca*Inoc. Res	7041,22	1	7041,22	0,05	0,8200	
Error	1290757,76	10	129075,78			
Total	3012077,00	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=526,20101

Error: 251415,3935 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
2	603,40	12	144,75	A
1	686,70	12	144,75	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=526,20101

Error: 251415,3935 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
2	603,40	12	144,75	A
1	686,70	12	144,75	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=326,80517

Error: 129075,7759 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
1	546,56	12	109,32	A
2	743,55	12	109,32	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=800,50591

Error: 129075,7759 gl: 10

Hojarasca	Bloque	Medias	n	E.E.	
1	5	284,70	2	267,78	A
2	3	308,94	2	267,78	A
2	6	453,55	2	267,78	A
1	4	484,32	2	267,78	A
1	6	503,94	2	267,78	A
2	1	528,04	2	267,78	A
2	2	585,71	2	267,78	A
2	4	798,01	2	267,78	A
1	2	901,58	2	267,78	A
1	1	930,99	2	267,78	A
2	5	946,19	2	267,78	A
1	3	1014,67	2	267,78	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=462,17230

Error: 129075,7759 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	1	487,78	6	154,61	A
1	1	605,33	6	154,61	A
2	2	719,03	6	154,61	A
1	2	768,07	6	154,61	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Anexo 2.

### Análisis de la varianza Remoción 2014

#### HOJAS ENFERMAS\_14

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
HOJAS ENFERMAS_14	24	0,83	0,61	49,97

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	17976,5	13	1382,81	3,72	0,022	
Bloque	14441,83	5	2888,37	7,77	0,003	
Hojarasca	1,5	1	1,5	0,01	0,939	(Bloque*Hojarasca)
Bloque*Hojarasca	1147,5	5	229,5	0,62	0,69	
Inoc. Res	2281,5	1	2281,5	6,14	0,033	
Hojarasca*Inoc. Res	104,17	1	104,17	0,28	0,608	
Error	3717,33	10	371,73			
Total	21693,83	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05

DMS=15,89817

Error: 229,5000 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
2	38,33	12	4,37	A
1	38,83	12	4,37	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05

DMS=17,53809

Error: 371,7333 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	28,83	12	5,57	A
1	48,33	12	5,57	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05

DMS=24,80261

Error: 371,7333 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	2	26,5	6	7,87	A
1	2	31,17	6	7,87	A
1	1	46,5	6	7,87	A
2	1	50,17	6	7,87	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

LESIONES\_14

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LESIONES_14	24	0,79	0,52	63,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	312643,54	13	24049,5	2,91	0,049	
Bloque	238074,21	5	47614,8	5,76	0,009	
Hojarasca	273,38	1	273,38	0,08	0,79	(Bloque*Hojarasca)
Bloque*Hojarasca	17282,88	5	3456,58	0,42	0,826	
Inoc. Res	53676,04	1	53676	6,49	0,029	
Hojarasca*Inoc. Res	3337,04	1	3337,04	0,4	0,54	
Error	82685,42	10	8268,54			
Total	395328,96	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05

DMS=61,69909

Error: 3456,5750 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	139,67	12	16,97	A
2	146,42	12	16,97	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05

DMS=82,71438

Error: 8268,5417 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	95,75	12	26,25	A
1	190,33	12	26,25	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=116,97579

Error: 8268,5417 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	2	87,33	6	37,12	A
1	2	104,17	6	37,12	A B
1	1	175,17	6	37,12	A B
2	1	205,5	6	37,12	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

GEMAS\_14

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
GEMAS_14	24	0,9	0,77	58,3

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	169372,54	13	13028,7	6,81	0,002	
Bloque	125418,71	5	25083,7	13,11	4E-04	
Hojarasca	287,04	1	287,04	0,08	0,792	(Bloque*Hojarasca)
Bloque*Hojarasca	18505,71	5	3701,14	1,93	0,175	
Inoc. Res	23126,04	1	23126	12,08	0,006	
Hojarasca*Inoc. Res	2035,04	1	2035,04	1,06	0,327	
Error	19140,42	10	1914,04			
Total	188512,96	23				



Test:LSD Fisher Alfa=0,05

DMS=63,84452

Error: 3701,1417 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	71,58	12	17,56	A
2	78,5	12	17,56	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05

DMS=39,79626

Error: 1914,0417 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	44	12	12,63	A
1	106,08	12	12,63	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05

DMS=56,28041

Error: 1914,0417 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
1	2	31,33	6	17,86	A
2	2	56,67	6	17,86	A
2	1	100,33	6	17,86	B
1	1	111,83	6	17,86	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

LXHt\_14

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LXHt_14	24	0,87	0,71	53,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	16,49	13	1,27	5,3	0,006	
Bloque	9,62	5	1,92	8,03	0,003	
Hojarasca	1,14	1	1,14	2,88	0,151	(Bloque*Hojarasca)
Bloque*Hojarasca	1,98	5	0,4	1,66	0,232	
Inoc. Res	3,57	1	3,57	14,91	0,003	

Hojarasca*Inoc. Res	0,18	1	0,18	0,76	0,403
Error	2,39	10	0,24		
Total	18,89	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,66089

Error: 0,3966 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	0,69	12	0,18	A
2	1,12	12	0,18	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,44516

Error: 0,2395 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	0,52	12	0,14	A
1	1,29	12	0,14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,62954

Error: 0,2395 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
1	2	0,39	6	0,2	A
2	2	0,65	6	0,2	A
1	1	0,99	6	0,2	A
2	1	1,6	6	0,2	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

GXLt\_14

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
GXLt_14		24	0,78	0,48	101,9

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	288,18	13	22,17	2,66	0,064	
Bloque	146,2	5	29,24	3,51	0,043	
Hojarasca	0,49	1	0,49	0,03	0,876	(Bloque*Hojarasca)
Bloque*Hojarasca	91,28	5	18,26	2,19	0,137	
Inoc. Res	47,4	1	47,4	5,68	0,038	
Hojarasca*Inoc. Res	2,79	1	2,79	0,33	0,576	
Error	83,39	10	8,34			
Total	371,57	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=4,48402

Error: 18,2568 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	2,69	12	1,23	A
2	2,98	12	1,23	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,62679

Error: 8,3390 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	1,43	12	0,83	A
1	4,24	12	0,83	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,71484

Error: 8,3390 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
1	2	0,94	6	1,18	A
2	2	1,91	6	1,18	A
2	1	4,04	6	1,18	A
1	1	4,44	6	1,18	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

ABCH14\_Tt

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCH14_Tt	24	0,92	0,81	30,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	143,69	13	11,05	8,39	0,001	
Bloque	112,05	5	22,41	17,02	1E-04	
Hojarasca	3,08	1	3,08	0,95	0,375	(Bloque*Hojarasca)
Bloque*Hojarasca	16,26	5	3,25	2,47	0,105	
Inoc. Res	12	1	12	9,12	0,013	
Hojarasca*Inoc. Res	0,3	1	0,3	0,23	0,642	
Error	13,17	10	1,32			
Total	156,86	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,89233

Error: 3,2515 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	3,39	12	0,52	A
2	4,11	12	0,52	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,04379

Error: 1,3167 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	3,04	12	0,33	A
1	4,46	12	0,33	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,47614

Error: 1,3167 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
1	2	2,8	6	0,47	A
2	2	3,29	6	0,47	A
1	1	3,99	6	0,47	A
2	1	4,93	6	0,47	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

ABCL14\_Tt

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCL14_Tt	24	0,92	0,81	30,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	185,16	13	14,24	8,44	9E-04	
Bloque	144,12	5	28,82	17,08	1E-04	
Hojarasca	4,91	1	4,91	1,28	0,31	(Bloque*Hojarasca)
Bloque*Hojarasca	19,26	5	3,85	2,28	0,125	
Inoc. Res	16,42	1	16,42	9,73	0,011	
Hojarasca*Inoc. Res	0,44	1	0,44	0,26	0,619	
Error	16,88	10	1,69			
Total	202,04	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,05982

Error: 3,8525 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	3,76	12	0,57	A
2	4,67	12	0,57	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,18172

Error: 1,6877 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	3,39	12	0,38	A
1	5,04	12	0,38	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,67120

Error: 1,6877 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
1	2	3,07	6	0,53	A
2	2	3,71	6	0,53	A
1	1	4,45	6	0,53	A
2	1	5,63	6	0,53	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

ABCPG14\_Tt

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCPG14_Tt	24	0,87	0,7	58,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	8313,07	13	639,47	5,12	0,007	
Bloque	4976,31	5	995,26	7,96	0,003	
Hojarasca	113,14	1	113,14	0,33	0,59	(Bloque*Hojarasca)
Bloque*Hojarasca	1712,79	5	342,56	2,74	0,082	
Inoc. Res	1505,34	1	1505,34	12,04	0,006	
Hojarasca*Inoc. Res	5,49	1	5,49	0,04	0,838	
Error	1249,91	10	124,99			
Total	9562,98	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05

DMS=19,42329

Error: 342,5580 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	17,09	12	5,34	A
2	21,44	12	5,34	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05

DMS=10,16966

Error: 124,9912 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	11,35	12	3,23	A
1	27,18	12	3,23	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05

DMS=14,38207

Error: 124,9912 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.			
1	2	8,7	6	4,56	A		
2	2	13,99	6	4,56	A	B	
1	1	25,49	6	4,56		B	C
2	1	28,88	6	4,56			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

ABCC14\_Tt

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCC14_Tt	24	0,88	0,72	3,17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	17260823,7	13	1327756	5,59	0,005	
Bloque	16090320,4	5	3218064	13,54	3E-04	
Hojarasca	73018,08	1	73018,1	0,39	0,559	(Bloque*Hojarasca)
Bloque*Hojarasca	930982,44	5	186196	0,78	0,584	
Inoc. Res	141557,84	1	141558	0,6	0,458	
Hojarasca*Inoc. Res	24944,94	1	24944,9	0,1	0,753	
Error	2376342,38	10	237634			
Total	19637166,1	23				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=452,83656

Error: 186196,4889 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
2	15320,61	12	124,56	A
1	15430,93	12	124,56	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=443,42590

Error: 237634,2380 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.
2	15298,97	12	140,72 A
1	15452,57	12	140,72 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=627,09892

Error: 237634,2380 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.
2	2	15276	6	199,01 A
1	2	15322	6	199,01 A
2	1	15365	6	199,01 A
1	1	15540	6	199,01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

ABCD14\_Tt

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCD14_Tt	24	0,87	0,69	16,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	34833045,6	13	2679465	4,98	0,008	
Bloque	21839104	5	4367821	8,12	0,003	
Hojarasca	333916,53	1	333917	0,16	0,706	(Bloque*Hojarasca)
Bloque*Hojarasca	10433585,1	5	2086717	3,88	0,033	
Inoc. Res	1284781,15	1	1284781	2,39	0,153	
Hojarasca*Inoc. Res	941658,78	1	941659	1,75	0,215	
Error	5380920,78	10	538092			
Total	40213966,4	23				



Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1515,95923

Error: 2086717,0221 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
1	4374,59	12	417	A
2	4610,5	12	417	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=667,25962

Error: 538092,0784 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	4261,17	12	211,76	A
1	4723,91	12	211,76	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=943,64761

Error: 538092,0784 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
2	2	4181,1	6	299,47	A
1	2	4341,3	6	299,47	A
1	1	4407,9	6	299,47	A
2	1	5040	6	299,47	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

ABCD OG14\_Tt

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCD OG14_Tt	24	0,89	0,74	40,74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	69,36	13	5,34	5,96	0,004	
Bloque	42	5	8,4	9,38	0,002	
Hojarasca	3,17	1	3,17	1,95	0,221	(Bloque*Hojarasca)
Bloque*Hojarasca	8,12	5	1,62	1,81	0,198	
Inoc. Res	14,8	1	14,8	16,52	0,002	
Hojarasca*Inoc. Res	1,27	1	1,27	1,42	0,262	
Error	8,96	10	0,9			

Total	78,32	23
-------	-------	----

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,33732

Error: 1,6239 gl: 5

Hojarasca	Medias	n	E.E.	
	1	1,96	12	0,37 A
	2	2,69	12	0,37 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,86099

Error: 0,8959 gl: 10

Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
	2	1,54	12	0,27 A
	1	3,11	12	0,27 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,21762

Error: 0,8959 gl: 10

Hojarasca	Inoc. Res	Medias	n	E.E.	
	1	2	1,4	6	0,39 A
	2	2	1,67	6	0,39 A
	1	1	2,52	6	0,39 A
	2	1	3,7	6	0,39 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Anexo 3.

Salidas de los análisis estadísticos para el experimento de Trichoderma.  
Comprobación supuestos de ANDEVA  
Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO_LT	9	0,00	146,83	0,85	0,1102
RDUO_ABCPE	9	-1,1E-03		957,74	0,87

Nueva tabla : 26/8/2015 - 11:34:57 a. m. - [Versión : 17/6/2015]

Análisis de la varianza  
RABS\_ABCPE

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS_ABCPE	9	0,06	0,00	67,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	99739,67	2	49869,83	0,18	0,8427
TRATAM	99739,67	2	49869,83	0,18	0,8427
Error	1699392,40	6	283232,07		
Total	1799132,07	8			

RABS\_LT

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS_LT	9	0,03	0,00	67,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1370,27	2	685,13	0,10	0,9026
TRATAM	1370,27	2	685,13	0,10	0,9026
Error	39415,78	6	6569,30		
Total	40786,04	8			

Análisis de la varianza  
LT

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LT	9	0,71	0,42	71,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	419383,11	4	104845,78	2,43	0,2053
BLOQUE	277389,56	2	138694,78	3,22	0,1470
TRATAM	141993,56	2	70996,78	1,65	0,3008
Error	172474,44	4	43118,61		
Total	591857,56	8			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=470,73421

Error: 43118,6111 gl: 4

BLOQUE	Medias	n	E.E.
2	56,67	3	119,89 A
1	332,33	3	119,89 A
3	480,33	3	119,89 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=470,73421

Error: 43118,6111 gl: 4

TRATAM	Medias	n	E.E.
1	128,33	3	119,89 A
3	306,33	3	119,89 A
2	434,67	3	119,89 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

ABCPE

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ABCPE	9	0,69	0,38	84,46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16489370,13	4	4122342,53	2,25	0,2261
BLOQUE	11428489,24	2	5714244,62	3,11	0,1529
TRATAM	5060880,89	2	2530440,44	1,38	0,3503
Error	7338097,87	4	1834524,47		
Total	23827467,99	8			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3070,47192

Error: 1834524,4664 gl: 4

BLOQUE	Medias	n	E.E.
2	193,45	3	781,99 A
1	1665,87	3	781,99 A
3	2951,59	3	781,99 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3070,47192

Error: 1834524,4664 gl: 4

TRATAM	Medias	n	E.E.
1	642,79	3	781,99 A
3	1695,41	3	781,99 A
2	2472,72	3	781,99 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Anexo 4.

Resultados de los análisis de matrices de correlación de Spearman y sus respectivas probabilidades, para los datos del ensayo de remoción de hojarasca e inóculo primario del año 2013 y 2014. Salidas de programa para análisis estadístico R.

### 2013

#### Tratamiento ConH/ConIP

Spearman correlations:

	G	GL	HE	HR	L	LH	MF	PREC	TEMP
G	1.0000	0.8980	0.7590	0.9411	0.7590	0.6983	0.8804	0.6983	-0.6983
GL	0.8980	1.0000	0.5409	0.8452	0.5409	0.3719	0.7775	0.3719	-0.3719
HE	0.7590	0.5409	1.0000	0.6571	1.0000	0.9429	0.8857	0.8857	-0.8857
HR	0.9411	0.8452	0.6571	1.0000	0.6571	0.6000	0.8857	0.7143	-0.7143
L	0.7590	0.5409	1.0000	0.6571	1.0000	0.9429	0.8857	0.8857	-0.8857
LH	0.6983	0.3719	0.9429	0.6000	0.9429	1.0000	0.7714	0.9429	-0.9429
MF	0.8804	0.7775	0.8857	0.8857	0.8857	0.7714	1.0000	0.8286	-0.8286
PREC	0.6983	0.3719	0.8857	0.7143	0.8857	0.9429	0.8286	1.0000	-1.0000
TEMP	-0.6983	-0.3719	-0.8857	-0.7143	-0.8857	-0.9429	-0.8286	-1.0000	1.0000

Number of observations: 6

Pairwise two-sided p-values:

	G	GL	HE	HR	L	LH	MF	PREC	TEMP
G		0.0151	0.0801	0.0051	0.0801	0.1228	0.0206	0.1228	0.1228
GL	0.0151		0.2678	0.0341	0.2678	0.4679	0.0687	0.4679	0.4679
HE	0.0801	0.2678		0.1562	<.0001	0.0048	0.0188	0.0188	0.0188
HR	0.0051	0.0341	0.1562		0.1562	0.2080	0.0188	0.1108	0.1108
L	0.0801	0.2678	<.0001	0.1562		0.0048	0.0188	0.0188	0.0188
LH	0.1228	0.4679	0.0048	0.2080	0.0048		0.0724	0.0048	0.0048
MF	0.0206	0.0687	0.0188	0.0188	0.0188	0.0724		0.0416	0.0416
PREC	0.1228	0.4679	0.0188	0.1108	0.0188	0.0048	0.0416		<.0001
TEMP	0.1228	0.4679	0.0188	0.1108	0.0188	0.0048	0.0416	<.0001	

#### Tratamiento ConH/SinIP

Spearman correlations:

	G	GL	HE	HR	L	LH	MF	PREC	TEMP
G	1.0000	1.0000	0.5409	0.8452	0.5409	0.3719	0.7775	0.3719	-0.3719
GL	1.0000	1.0000	0.5409	0.8452	0.5409	0.3719	0.7775	0.3719	-0.3719

HE	0.5409	0.5409	1.0000	0.6571	1.0000	0.9429	0.8857	0.8857	-0.8857
HR	0.8452	0.8452	0.6571	1.0000	0.6571	0.6000	0.8857	0.7143	-0.7143
L	0.5409	0.5409	1.0000	0.6571	1.0000	0.9429	0.8857	0.8857	-0.8857
LH	0.3719	0.3719	0.9429	0.6000	0.9429	1.0000	0.7714	0.9429	-0.9429
MF	0.7775	0.7775	0.8857	0.8857	0.8857	0.7714	1.0000	0.8286	-0.8286
PREC	0.3719	0.3719	0.8857	0.7143	0.8857	0.9429	0.8286	1.0000	-1.0000
TEMP	-0.3719	-0.3719	-0.8857	-0.7143	-0.8857	-0.9429	-0.8286	-1.0000	1.0000

Number of observations: 6

Pairwise two-sided p-values:

	G	GL	HE	HR	L	LH	MF	PREC	TEMP
G		<.0001	0.2678	0.0341	0.2678	0.4679	0.0687	0.4679	0.4679
GL	<.0001		0.2678	0.0341	0.2678	0.4679	0.0687	0.4679	0.4679
HE	0.2678	0.2678		0.1562	<.0001	0.0048	0.0188	0.0188	0.0188
HR	0.0341	0.0341	0.1562		0.1562	0.2080	0.0188	0.1108	0.1108
L	0.2678	0.2678	<.0001	0.1562		0.0048	0.0188	0.0188	0.0188
LH	0.4679	0.4679	0.0048	0.2080	0.0048		0.0724	0.0048	0.0048
MF	0.0687	0.0687	0.0188	0.0188	0.0188	0.0724		0.0416	0.0416
PREC	0.4679	0.4679	0.0188	0.1108	0.0188	0.0048	0.0416		<.0001
TEMP	0.4679	0.4679	0.0188	0.1108	0.0188	0.0048	0.0416	<.0001	

### Tratamiento SinH/ConIP

Spearman correlations:

	G	GL	HE	HR	L	LH	MF	PREC	TEMP
G	1.0000	1.0000	0.5409	0.8452	0.5409	0.3719	0.7775	0.3719	-0.3719
GL	1.0000	1.0000	0.5409	0.8452	0.5409	0.3719	0.7775	0.3719	-0.3719
HE	0.5409	0.5409	1.0000	0.6571	1.0000	0.9429	0.8857	0.8857	-0.8857
HR	0.8452	0.8452	0.6571	1.0000	0.6571	0.6000	0.8857	0.7143	-0.7143
L	0.5409	0.5409	1.0000	0.6571	1.0000	0.9429	0.8857	0.8857	-0.8857
LH	0.3719	0.3719	0.9429	0.6000	0.9429	1.0000	0.7714	0.9429	-0.9429
MF	0.7775	0.7775	0.8857	0.8857	0.8857	0.7714	1.0000	0.8286	-0.8286
PREC	0.3719	0.3719	0.8857	0.7143	0.8857	0.9429	0.8286	1.0000	-1.0000
TEMP	-0.3719	-0.3719	-0.8857	-0.7143	-0.8857	-0.9429	-0.8286	-1.0000	1.0000

Number of observations: 6

Pairwise two-sided p-values:

	G	GL	HE	HR	L	LH	MF	PREC	TEMP
G		<.0001	0.2678	0.0341	0.2678	0.4679	0.0687	0.4679	0.4679
GL	<.0001		0.2678	0.0341	0.2678	0.4679	0.0687	0.4679	0.4679
HE	0.2678	0.2678		0.1562	<.0001	0.0048	0.0188	0.0188	0.0188

HR	0.0341	0.0341	0.1562		0.1562	0.2080	0.0188	0.1108	0.1108
L	0.2678	0.2678	<.0001	0.1562		0.0048	0.0188	0.0188	0.0188
LH	0.4679	0.4679	0.0048	0.2080	0.0048		0.0724	0.0048	0.0048
MF	0.0687	0.0687	0.0188	0.0188	0.0188	0.0724		0.0416	0.0416
PREC	0.4679	0.4679	0.0188	0.1108	0.0188	0.0048	0.0416		<.0001
TEMP	0.4679	0.4679	0.0188	0.1108	0.0188	0.0048	0.0416	<.0001	

### Tratamiento SinH/SinIP

Spearman correlations:

	G	GL	HE	HR	L	LH	MF	PREC	TEMP
G	1.0000	0.8262	0.8804	0.8804	0.8804	0.7590	0.9411	0.7590	-0.7590
GL	0.8262	1.0000	0.5409	0.8452	0.5409	0.3719	0.7775	0.3719	-0.3719
HE	0.8804	0.5409	1.0000	0.6571	1.0000	0.9429	0.8857	0.8857	-0.8857
HR	0.8804	0.8452	0.6571	1.0000	0.6571	0.6000	0.8857	0.7143	-0.7143
L	0.8804	0.5409	1.0000	0.6571	1.0000	0.9429	0.8857	0.8857	-0.8857
LH	0.7590	0.3719	0.9429	0.6000	0.9429	1.0000	0.7714	0.9429	-0.9429
MF	0.9411	0.7775	0.8857	0.8857	0.8857	0.7714	1.0000	0.8286	-0.8286
PREC	0.7590	0.3719	0.8857	0.7143	0.8857	0.9429	0.8286	1.0000	-1.0000
TEMP	-0.7590	-0.3719	-0.8857	-0.7143	-0.8857	-0.9429	-0.8286	-1.0000	1.0000

Number of observations: 6

Pairwise two-sided p-values:

	G	GL	HE	HR	L	LH	MF	PREC	TEMP
G		0.0427	0.0206	0.0206	0.0206	0.0801	0.0051	0.0801	0.0801
GL	0.0427		0.2678	0.0341	0.2678	0.4679	0.0687	0.4679	0.4679
HE	0.0206	0.2678		0.1562	<.0001	0.0048	0.0188	0.0188	0.0188
HR	0.0206	0.0341	0.1562		0.1562	0.2080	0.0188	0.1108	0.1108
L	0.0206	0.2678	<.0001	0.1562		0.0048	0.0188	0.0188	0.0188
LH	0.0801	0.4679	0.0048	0.2080	0.0048		0.0724	0.0048	0.0048
MF	0.0051	0.0687	0.0188	0.0188	0.0188	0.0724		0.0416	0.0416
PREC	0.0801	0.4679	0.0188	0.1108	0.0188	0.0048	0.0416		<.0001
TEMP	0.0801	0.4679	0.0188	0.1108	0.0188	0.0048	0.0416	<.0001	

**2014**

### Tratamiento ConH/ConIP

Spearman correlations:

	Gemas	GXL	Hojas.Enf.	Horas.MF	HR.prom.	Lesiones	LXH
Gemas	1.0000	0.7500	-0.1622	0.4077	0.9286	0.1786	0.1786
GXL	0.7500	1.0000	0.4685	0.5559	0.7857	0.7143	0.7143

Hojas.Enf.	-0.1622	0.4685	1.0000	0.5797	-0.1261	0.8829	0.8829
Horas.MF	0.4077	0.5559	0.5797	1.0000	0.2224	0.7042	0.7042
HR.prom.	0.9286	0.7857	-0.1261	0.2224	1.0000	0.2500	0.2500
Lesiones	0.1786	0.7143	0.8829	0.7042	0.2500	1.0000	1.0000
LXH	0.1786	0.7143	0.8829	0.7042	0.2500	1.0000	1.0000
Precip..Total	0.8571	0.5357	-0.2523	0.1853	0.8571	0.0000	0.0000
Temp..Prom.	-0.8929	-0.8571	-0.0901	-0.4077	-0.9643	-0.4643	-0.4643
	Precip..Total		Temp..Prom.				
Gemas	0.8571		-0.8929				
GXL	0.5357		-0.8571				
Hojas.Enf.	-0.2523		-0.0901				
Horas.MF	0.1853		-0.4077				
HR.prom.	0.8571		-0.9643				
Lesiones	0.0000		-0.4643				
LXH	0.0000		-0.4643				
Precip..Total	1.0000		-0.8214				
Temp..Prom.	-0.8214		1.0000				

Number of observations: 7

Pairwise two-sided p-values:

	Gemas	GXL	Hojas.Enf.	Horas.MF	HR.prom.	Lesiones	LXH
Gemas		0.0522	0.7283	0.3639	0.0025	0.7017	
GXL	0.0522		0.2890	0.1950	0.0362	0.0713	
Hojas.Enf.	0.7283	0.2890		0.1726	0.7876	0.0085	
Horas.MF	0.3639	0.1950	0.1726		0.6317	0.0774	
HR.prom.	0.0025	0.0362	0.7876	0.6317		0.5887	
Lesiones	0.7017	0.0713	0.0085	0.0774	0.5887		
LXH	0.7017	0.0713	0.0085	0.0774	0.5887	<.0001	
Precip..Total	0.0137	0.2152	0.5852	0.6908	0.0137	1.0000	
Temp..Prom.	0.0068	0.0137	0.8477	0.3639	0.0005	0.2939	
	Precip..Total		Temp..Prom.				
Gemas	0.0137		0.0068				
GXL	0.2152		0.0137				
Hojas.Enf.	0.5852		0.8477				
Horas.MF	0.6908		0.3639				
HR.prom.	0.0137		0.0005				
Lesiones	1.0000		0.2939				
LXH	1.0000		0.2939				
Precip..Total			0.0234				
Temp..Prom.	0.0234						



# Tratamiento ConH/SinIP

Spearman correlations:

	Gemas	GXL	Hojas.Enf.	Horas.MF	HR.prom.	Lesiones	LXH
Gemas	1.0000	0.6071	-0.1622	0.4077	0.9286	0.1786	0.1786
GXL	0.6071	1.0000	0.6307	0.6671	0.6071	0.8214	0.8214
Hojas.Enf.	-0.1622	0.6307	1.0000	0.5797	-0.1261	0.8829	0.8829
Horas.MF	0.4077	0.6671	0.5797	1.0000	0.2224	0.7042	0.7042
HR.prom.	0.9286	0.6071	-0.1261	0.2224	1.0000	0.2500	0.2500
Lesiones	0.1786	0.8214	0.8829	0.7042	0.2500	1.0000	1.0000
LXH	0.1786	0.8214	0.8829	0.7042	0.2500	1.0000	1.0000
Precip..Total	0.8571	0.3214	-0.2523	0.1853	0.8571	0.0000	0.0000
Temp..Prom.	-0.8929	-0.7143	-0.0901	-0.4077	-0.9643	-0.4643	-0.4643
	Precip..Total		Temp..Prom.				
Gemas	0.8571		-0.8929				
GXL	0.3214		-0.7143				
Hojas.Enf.	-0.2523		-0.0901				
Horas.MF	0.1853		-0.4077				
HR.prom.	0.8571		-0.9643				
Lesiones	0.0000		-0.4643				
LXH	0.0000		-0.4643				
Precip..Total	1.0000		-0.8214				
Temp..Prom.	-0.8214		1.0000				

Number of observations: 7

Pairwise two-sided p-values:

	Gemas	GXL	Hojas.Enf.	Horas.MF	HR.prom.	Lesiones	LXH
Gemas		0.1482	0.7283	0.3639	0.0025	0.7017	0.7017
GXL	0.1482		0.1289	0.1016	0.1482	0.0234	0.0234
Hojas.Enf.	0.7283	0.1289		0.1726	0.7876	0.0085	0.0085
Horas.MF	0.3639	0.1016	0.1726		0.6317	0.0774	0.0774
HR.prom.	0.0025	0.1482	0.7876	0.6317		0.5887	0.5887
Lesiones	0.7017	0.0234	0.0085	0.0774	0.5887		<.0001
LXH	0.7017	0.0234	0.0085	0.0774	0.5887	<.0001	
Precip..Total	0.0137	0.4821	0.5852	0.6908	0.0137	1.0000	1.0000
Temp..Prom.	0.0068	0.0713	0.8477	0.3639	0.0005	0.2939	0.2939
	Precip..Total		Temp..Prom.				
Gemas	0.0137		0.0068				
GXL	0.4821		0.0713				
Hojas.Enf.	0.5852		0.8477				
Horas.MF	0.6908		0.3639				

HR.prom.	0.0137	0.0005
Lesiones	1.0000	0.2939
LXH	1.0000	0.2939
Precip..Total		0.0234
Temp..Prom.	0.0234	

### Tratamiento SinH/ConIP

pearman correlations:

	Gemas	GXL	Hojas.Enf.	Horas.MF	HR.prom.	Lesiones	LXH
Gemas	1.0000	0.7857	-0.2523	0.2965	0.9643	0.1429	0.1429
GXL	0.7857	1.0000	0.3424	0.5189	0.8571	0.6429	0.6429
Hojas.Enf.	-0.2523	0.3424	1.0000	0.5797	-0.1261	0.8829	0.8829
Horas.MF	0.2965	0.5189	0.5797	1.0000	0.2224	0.7042	0.7042
HR.prom.	0.9643	0.8571	-0.1261	0.2224	1.0000	0.2500	0.2500
Lesiones	0.1429	0.6429	0.8829	0.7042	0.2500	1.0000	1.0000
LXH	0.1429	0.6429	0.8829	0.7042	0.2500	1.0000	1.0000
Precip..Total	0.8929	0.6429	-0.2523	0.1853	0.8571	0.0000	0.0000
Temp..Prom.	-0.9286	-0.9286	-0.0901	-0.4077	-0.9643	-0.4643	-0.4643
	Precip..Total	Temp..Prom.					
Gemas	0.8929	-0.9286					
GXL	0.6429	-0.9286					
Hojas.Enf.	-0.2523	-0.0901					
Horas.MF	0.1853	-0.4077					
HR.prom.	0.8571	-0.9643					
Lesiones	0.0000	-0.4643					
LXH	0.0000	-0.4643					
Precip..Total	1.0000	-0.8214					
Temp..Prom.	-0.8214	1.0000					

Number of observations: 7

Pairwise two-sided p-values:

	Gemas	GXL	Hojas.Enf.	Horas.MF	HR.prom.	Lesiones	LXH
Gemas		0.0362	0.5852	0.5185	0.0005	0.7599	
0.7599							
GXL	0.0362		0.4523	0.2328	0.0137	0.1194	
0.1194							
Hojas.Enf.	0.5852	0.4523		0.1726	0.7876	0.0085	
0.0085							
Horas.MF	0.5185	0.2328	0.1726		0.6317	0.0774	
0.0774							
HR.prom.	0.0005	0.0137	0.7876	0.6317		0.5887	
0.5887							
Lesiones	0.7599	0.1194	0.0085	0.0774	0.5887		
<.0001							
LXH	0.7599	0.1194	0.0085	0.0774	0.5887	<.0001	

Precip..Total	0.0068	0.1194	0.5852	0.6908	0.0137	1.0000
1.0000						
Temp..Prom.	0.0025	0.0025	0.8477	0.3639	0.0005	0.2939
0.2939						
	Precip..Total		Temp..Prom.			
Gemas	0.0068		0.0025			
GXL	0.1194		0.0025			
Hojas.Enf.	0.5852		0.8477			
Horas.MF	0.6908		0.3639			
HR.prom.	0.0137		0.0005			
Lesiones	1.0000		0.2939			
LXH	1.0000		0.2939			
Precip..Total			0.0234			
Temp..Prom.	0.0234					

### Tratamiento SinH/SinIP

Spearman correlations:

	Gemas	GXL	Hojas.Enf.	Horas.MF	HR.prom.	Lesiones	LXH
Gemas	1.0000	0.7857	-0.2523	0.2965	0.9643	0.1429	0.1429
GXL	0.7857	1.0000	0.3424	0.5189	0.8571	0.6429	0.6429
Hojas.Enf.	-0.2523	0.3424	1.0000	0.5797	-0.1261	0.8829	0.8829
Horas.MF	0.2965	0.5189	0.5797	1.0000	0.2224	0.7042	0.7042
HR.prom.	0.9643	0.8571	-0.1261	0.2224	1.0000	0.2500	0.2500
Lesiones	0.1429	0.6429	0.8829	0.7042	0.2500	1.0000	1.0000
LXH	0.1429	0.6429	0.8829	0.7042	0.2500	1.0000	1.0000
Precip..Total	0.8929	0.6429	-0.2523	0.1853	0.8571	0.0000	0.0000
Temp..Prom.	-0.9286	-0.9286	-0.0901	-0.4077	-0.9643	-0.4643	-0.4643
	Precip..Total		Temp..Prom.				
Gemas	0.8929		-0.9286				
GXL	0.6429		-0.9286				
Hojas.Enf.	-0.2523		-0.0901				
Horas.MF	0.1853		-0.4077				
HR.prom.	0.8571		-0.9643				
Lesiones	0.0000		-0.4643				
LXH	0.0000		-0.4643				
Precip..Total	1.0000		-0.8214				
Temp..Prom.	-0.8214		1.0000				

Number of observations: 7

Pairwise two-sided p-values:

	Gemas	GXL	Hojas.Enf.	Horas.MF	HR.prom.	Lesiones	LXH
Gemas							
0.7599		0.0362	0.5852	0.5185	0.0005	0.7599	

GXL	0.0362		0.4523	0.2328	0.0137	0.1194
0.1194						
Hojas.Enf.	0.5852	0.4523		0.1726	0.7876	0.0085
0.0085						
Horas.MF	0.5185	0.2328	0.1726		0.6317	0.0774
0.0774						
HR.prom.	0.0005	0.0137	0.7876	0.6317		0.5887
0.5887						
Lesiones	0.7599	0.1194	0.0085	0.0774	0.5887	
<.0001						
LXH	0.7599	0.1194	0.0085	0.0774	0.5887	<.0001
Precip..Total	0.0068	0.1194	0.5852	0.6908	0.0137	1.0000
1.0000						
Temp..Prom.	0.0025	0.0025	0.8477	0.3639	0.0005	0.2939
0.2939						
	Precip..Total	Temp..Prom.				
Gemas	0.0068	0.0025				
GXL	0.1194	0.0025				
Hojas.Enf.	0.5852	0.8477				
Horas.MF	0.6908	0.3639				
HR.prom.	0.0137	0.0005				
Lesiones	1.0000	0.2939				
LXH	1.0000	0.2939				
Precip..Total		0.0234				
Temp..Prom.	0.0234					